

Sphaeroidkörper der Diatomee *Rhopalodia gibba* – Obligate Endosymbionten zur molekularen Stickstofffixierung

DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

dem Fachbereich Biologie
der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

Christoph Kneip
aus Bernkastel-Kues

Marburg/Lahn, 2004

Vom Fachbereich Biologie der
Philipps-Universität Marburg
als Dissertation am

09.11.2004 angenommen.

Erstgutachter

: Prof. Dr. Uwe-G. Maier

Zweitgutachter

: Prof. Dr. Klaus Lingelbach

Tag der mündlichen Prüfung am

: 25.11.2004

Für Familie und
Freunde

Aus der vorliegenden Arbeit sind folgende Publikationen entstanden:

Prechtel J, Kneip C, Lockhart P, Wenderoth K, Maier UG: **Intracellular Spheroid Bodies of *Rhopalodia gibba* Have Nitrogen-Fixing Apparatus of Cyanobacterial Origin.** *Mol Biol Evol.* 2004, **21**: 1477-1481

Kneip C, Lockhart P, Maier UG: **Nitrogen fixation in eukaryotes: a model for symbiosis?** *Trends Plant Sci.* 2004, (sub.)

I. Abkürzungsverzeichnis

2-ME	2-Mercaptoethanol	PIPES	1,4-Piperazindiethansulfonsäure
A	Adenin, Ampere	Nt	Nukleotide
Amp	Ampicillin	OD	Optische Dichte
APS	Amoniumpersulfat	orf	<i>open reading frame</i>
bp	Basenpaar(e)	PCR	Polymerase Ketten Reaktion
BSA	<i>bovine serum albumin</i>	PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
Bq	Bequerel	PS	Photosystem
C	Cytosin	rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure
Cam	Chloramphenicol	rpm	Umdrehungen (<i>rounds</i>) pro Minute
Ci	Curie	RT	Raumtemperatur
CTAB	Cetyltrimethylammonium Bromid	SDS	Natriumdodecylsulfat
Cpm	counts per minute	sek	Sekunde
Dig	Digoxigenin	SLS	Natriumlauroylsulfat
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>	T	Thymin
EDTA	Ethylendiamintetraacetat	TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylen- diamin
ER	Endoplasmatisches Retikulum	Tris	Tris (hydroxymethyl)-amino-methan
EtOH	Ethanol	U	<i>units</i> (als Enzymaktivität)
G	Guanosin	UE	Untereinheit
gDNA	genomische DNA	V	Volt
h	Stunde	Vol	Volumen
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'- 2-Ethansulfonsäure	X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indolyl- β -D- galactopyranosid
IgG	Immunglobulin G		
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactosid		
K	Kelvin		
Kan	Kanamycin		
kbp	Kilobasenpaare		
kDa	Kilodalton		
lx	Lux		
Mb	Megabasenpaare		
min	Minute		
MOPS	3'-Morpholino-propansulfonsäure		
mRNA	<i>messenger</i> -Ribonukleinsäure		

II. Abbildungen und Tabellen

Abb. 1-1:	Übergang von freilebenden Mikroorganismen zu intrazellulärer symbiontischer Lebensweise und Entstehung semi-autonomer Organelle	4
Abb. 1-2:	Cyanobakterielle Assoziationen mit Pflanzen und eukaryoten Einzellern	8
Abb. 1-3:	Fixierung von molekularem Stickstoff durch Nitrogenase	10
Abb. 1-4:	Entstehung der Heterokontophyten durch sekundäre Endocytobiose	12
Abb. 1-5:	<i>Rhopalodia gibba</i> und Sphaeroidkörper	13
Abb. 3-1:	Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme von <i>Rhopalodia gibba</i>	42
Abb. 3-2:	Elektronenmikroskopische Aufnahme eines Sphaeroidkörpers innerhalb <i>Rhopalodia gibba</i> .	43
Abb. 3-3:	Messung der Stickstofffixierung von <i>Rhopalodia gibba</i> Kulturen mit dem Acetylenreduktionsassay	45
Abb. 3-4:	Percollgradient zur Isolation intakter Sphaeroidkörper	46
Abb. 3-5:	Mikroskopische Aufnahme isolierter Sphaeroidkörper	47
Abb. 3-6:	Analyse von Sphaeroidkörper DNA	48
Abb. 3-7:	<i>Southern</i> -Analyse der 16S-PCR-Amplifikate verschiedener DNA-Fraktionen	50
Abb. 3-8:	<i>In-situ</i> Hybridisierung der aus Sphaeroidkörper-Isolationen gewonnenen 16S rDNA an ganzen <i>R. gibba</i> Zellen	51
Abb. 3-9:	<i>Neighbour joining</i> Primäranalyse der Sphaeroidkörper 16S rDNA Sequenz	53
Abb. 3-10:	<i>Minimum-evolution</i> Analyse verschiedener 16S rDNA Sequenzen	54
Abb. 3-11:	<i>Minimum-evolution</i> Analyse anhand der NifD-Aminosäuresequenzen	56
Abb. 3-12:	Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahme der <i>in situ</i> -Lokalisation der α -Untereinheit des Fe/Mo-Proteins in <i>R. gibba</i> -Zellen	57
Abb. 3-13:	UV/Vis-Absorptionsspektren von isolierten Sphaeroidkörpern und <i>Cyanothece</i> sp. ATCC 51142	59
Abb. 3-14:	<i>Screening</i> und Sequenzierung von ausgewählten Fosmidklonen	63
Abb. 3-15:	Ergebnis der Sequenzierung und Analyse des Genomfragments von <i>Cyanothece</i> sp. ATCC 51142	65
Abb. 3-16:	Ergebnis der Sequenzierung und Analyse des Sphaeroidkörper Genomfragments	68
Abb. 3-17:	Vergleichende Darstellung der sequenzierten Genomfragmente	71
Abb. 3-18:	Alignment von <i>Cyanothece-fdxN</i> mit drei möglichen Leserahmen der korrespondierenden Region der Sphaeroidkörper	74
Abb. 3-19:	Ergebnis der <i>Southern</i> - und Dot-Blot-Hybridisierungen genomischer DNAs mit [³² P]dCTP 5'- <i>nifU</i> -Sonde	75
Abb. 3-20:	<i>vap</i> -Region von <i>Cyanothece</i> und Sphaeroidkörpern	76
Abb. 3-21:	Ergebnis der <i>Southern</i> - und Dot-Blot-Hybridisierungen genomischer DNAs mit [³² P]dCTP <i>cyl0016</i> -Sonde	76
Abb. 3-22:	Ergebnis der <i>Southern</i> - und Dot-Blot-Hybridisierungen genomischer DNAs mit [³² P]dCTP <i>petE</i> -Sonde	77
Abb. 3-23:	Aminosäure-Alignment der RecA-Fragmente aus <i>Cyanothece</i> und Sphaeroidkörpern	78

II. Abbildungen und Tabellen

Tab. 1-1:	Ausgewählte symbiontische Interaktionen von Bakterien mit verschiedenen eukaryoten Wirten	6
Tab. 3-1:	Zusammenfassung der allgemeinen Genomanalyse anhand der sequenzierten Bereiche von <i>Cyanothece</i> sp. und Sphaeroidkörpern	70
Tab. 4-1:	A/T-Gehalt der bekannten Genomsequenzen verschiedener freilebender Cyanobakterien und permanenter bakterieller Endosymbionten	94
Tab. 4-2:	Häufigkeit von Adenin (A) odet Thymin (T) an den verschiedenen Codon-Positionen	96

III. Inhaltsverzeichnis

I. Abkürzungsverzeichnis

II. Abbildungen und Tabellen

III. Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Grundlagen von Symbiosen	1
1.2	Evolution von Symbiosen	2
1.2.1	Von freilebenden Bakterien zu permanenten und obligaten Endosymbionten	2
1.2.2	Endosymbiontentheorie und Entstehung semiautonomer Organelle	4
1.3	Bakterielle Symbiosen mit Pflanzen und Pilzen	6
1.4	Cyanobakterielle Symbiosen mit Einzellern (Protisten)	8
1.5	Die symbiontische Stickstofffixierung	9
1.6	Phytoplankton und Diatomeen	11
1.7	<i>Rhopalodia gibba</i> und Sphaeroidkörper	12
1.8	Zielsetzung dieser Arbeit	13
2	Material und Methoden	15
2.1	Material	15
2.1.1	Chemikalien	15
2.1.2	Puffer und Lösungen	16
2.1.3	Filter, Membranen und Säulen	16
2.1.4	Radiochemikalien	17
2.1.5	Photomaterialien	17
2.1.6	Molekularbiologische Kits	17
2.1.6.1	Enzyme	18
2.1.7	DNA-Längenstandards	18
2.1.8	Oligonukleotide	18
2.1.9	Antikörper	20
2.1.10	Vektoren	20
2.1.11	Bakterienstämme	20
2.1.12	Kulturmedien	21
2.1.12.1	Medium für <i>E. coli</i>	21
2.1.12.2	Kultur-Medium und Wachstumsbedingungen für <i>Cyanothece</i> sp. ATCC51142	22
2.1.12.3	Kulturmedium für <i>Rhopalodia gibba</i>	23
2.1.13	Geräte	24
2.1.14	Software	25
2.2	Methoden	26
2.2.1	Kultur von Algen und Cyanobakterien	26
2.2.1.1	Kultur von <i>Cyanothece</i> sp. ATCC 51142	26
2.2.1.2	Kultur von <i>Rhopalodia gibba</i>	26
2.2.2	Generelle molekularbiologische Methoden	26
2.2.2.1	Plasmidisolation aus <i>E. coli</i>	26
2.2.2.2	Isolierung von Fosmid-DNA	27
2.2.2.3	Isolierung genomischer DNA aus <i>Cyanothece</i> sp. ATCC51142	28
2.2.2.4	Isolierung genomischer DNA aus Sphaeroidkörpern von <i>Rhopalodia gibba</i>	28
2.2.2.5	Isolierung genomischer DNA aus <i>Rhopalodia gibba</i>	28
2.2.2.6	Transformation von <i>E. coli</i> XL1Blue MRF'	29

2.2.3 Isolation von Sphaeroidkörpern aus <i>Rhopalodia gibba</i>	29
2.2.4 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	30
2.2.5 DNA-Sequenzierung	30
2.2.5.1 Das LICOR System	30
2.2.6 Analyse fluoreszenzmarkierter DNA-Stränge durch Sequenzier-automaten	31
2.2.7 Auswertung der Sequenzen	32
2.2.8 Herstellung von Fosmid-Bibliotheken	32
2.2.8.1 <i>End-Repair</i> von Insert-DNA	32
2.2.8.2 Größenfraktionierung von DNA durch Pulsfeldgelelektrophorese (PFGE)	33
2.2.8.3 Elution von Insert-DNA aus PFGE-Agarosegelen	33
2.2.8.4 Fosmid-Ligation und Phagen-Transduktion von <i>E. coli</i> EPI300-T1 ^R	34
2.2.9 <i>Screening</i> der Fosmid-Bibliotheken nach ausgewählten Klonen	35
2.2.9.1 <i>Screening</i> mittels Kolonie-PCR	35
2.2.9.2 <i>Screening</i> mittels Kolonie-Blot	35
2.2.10 Herstellung von Shotgun-Plasmid-Bibliotheken	36
2.2.11 <i>Southern</i> - und Dot-Blot	37
2.2.12 Synthese radioaktiver und nicht-radioaktiver DNA-Sonden	38
2.2.13 Hybridisierung von <i>Southern</i> -, Dot- und Kolonie-Blotmembranen	39
2.2.14 <i>In-situ</i> Lokalisationsstudien an <i>Rhopalodia gibba</i>	39
2.2.15 <i>In-situ</i> Hybridisierungen an <i>Rhopalodia gibba</i>	40
2.2.16 UV/Vis Spektroskopie	40
2.2.17 Acetylen-Reduktionsassay	40
2.2.18 Herstellung von Gesamtproteinextrakt aus <i>Rhopalodia gibba</i>	41
2.2.19 Proteinbestimmung nach Bradford	41
2.2.20 Phylogenetische Analysen	41
3 Ergebnisse	42
3.1 Morphologische Untersuchungen an <i>Rhopalodia gibba</i>	42
3.2 Messung der Nitrogenase-Aktivität von <i>Rhopalodia gibba</i>	44
3.3 Isolation intakter Sphaeroidkörper aus <i>Rhopalodia gibba</i>	46
3.4 Isolierung genomischer DNA aus Sphaeroidkörpern	48
3.5 Amplifikation und Analyse der Sphaeroidkörper-16S rDNA	49
3.5.1 <i>Southern</i> -Hybridisierung von Sphaeroidkörper gDNA	49
3.5.2 <i>In-situ</i> Hybridisierung von Sphaeroidkörper 16S rDNA	51
3.5.3 Phylogenetische Analyse der Sphaeroidkörper 16S rDNA-Sequenz	52
3.6 Amplifikation von <i>nifD</i> aus Sphaeroidkörper-DNA	55
3.6.1 Phylogenetische Analyse der NifD Aminosäuresequenz	56
3.6.2 <i>In-situ</i> Lokalisation der Nitrogenase Fe/Mo-Untereinheit	57
3.7 UV/Vis-Spektroskopie an isolierten Sphaeroidkörpern	58
3.8 Genomanalyse von Sphaeroidkörpern und <i>Cyanothece</i> sp. ATCC 51142	60
3.8.1 Herstellung von Fosmidbibliotheken	60
3.8.2 <i>Screening</i> der Fosmidklone nach <i>nifD</i> und Sequenzierung positiver Klone	62
3.9 Sequenzanalyse der Genomfragmente von Sphaeroidkörpern und <i>Cyanothece</i> sp. ATCC51142	63
3.9.1 Sequenzanalyse des Genomfragments von <i>Cyanothece</i> sp. ATCC 51142	64
3.9.2 Sequenzanalyse des Sphaeroidkörper-Genomfragments	67
3.9.3 Vergleichende Analyse der sequenzierten Genombereiche der Sphaeroidkörper und <i>Cyanothece</i> sp. ATCC 51142	69
3.10 Analyse ausgewählter Regionen der Genomfragmente	73
3.10.1 Analyse des <i>fdxN</i> -Gens	73
3.10.2 Analyse des <i>nifU</i> -Gens	74
3.10.3 Analyse der <i>vap</i> -Region	75

3.10.4 Analyse des <i>Plastocyanin</i> -Gens	77
3.11 Analyse von <i>recA</i> als Bestandteil des DNA-Reparatur-Systems.....	78
4 Diskussion	80
4.1 Sphaeroidkörper als intrazelluläre Bakterien	80
4.2 Stickstofffixierung durch Sphaeroidkörper	81
4.2.1 Mechanismen zum Schutz der Nitrogenase	83
4.3 Anpassung der Sphaeroidkörper an die endosymbiontische Lebensweise	85
4.3.1 Lichtabhängige Stickstofffixierung und Verlust der Photosynthese-Aktivität in Sphaeroidkörpern	86
4.3.2 Kontrolle des Zellzyklus der Sphaeroidkörper.....	87
4.3.3 Transversale Weitergabe der Sphaeroidkörper	88
4.4 Status der Sphaeroidkörper- <i>Rhopalodia</i> -Symbiose	89
4.5 Analyse des Sphaeroidkörper-Genoms	91
4.5.1 Sphaeroidkörper-Gene und Gendichte	92
4.5.2 A/T-Gehalt und Codon-Nutzung der Sphaeroidkörper	93
4.5.3 Mutation, Verkürzung und Deletion von Genen	97
4.5.4 A/T-reiche, nicht-kodierende Regionen im Sphaeroidkörper-Genom	98
4.6 Genetische Modifikation der Sphaeroidkörper im Vergleich zu anderen intrazellulären Bakterien	100
4.7 Sphaeroidkörper: eine Vorstufe zu stickstofffixierenden Organellen?	102
4.8 Ausblick	103
5 Zusammenfassung	104
6 Literatur	106
7 Anhang	114
7.1 <i>Accession</i> -Nummern der Organismen für die phylogenetische 16S-Analyse.....	114
7.2 <i>Accession</i> -Nummern der Organismen für die phylogenetische <i>NifD</i> -Analyse.....	115
7.3 Oligonukleotide zum Schließen von Lücken zwischen Fosmid-Contigs.....	116
7.4 Aminosäuren-Bezeichnung und -Abkürzungen	117

1 Einleitung

1.1 Grundlagen von Symbiosen

Leben, wie es sich heute darstellt, ist das Ergebnis vielseitiger Wechselwirkungen zwischen unterschiedlichen Lebewesen. Ob Bakterien, eukaryote Einzeller oder Vielzeller, Organismen leben nicht isoliert voneinander, sondern sind auf verschiedene Art und Weise mit anderen Zellen oder Individuen vergesellschaftet. Eine solche Interaktion von Organismen verschiedener Arten kann unterschiedliche Ausprägungen haben, welche als Symbiose, Kommensalismus und Parasitismus bezeichnet werden. Eine Interaktion zum Nutzen des einen und Schaden des anderen Partners wird Parasitismus genannt, Kommensalismus bezeichnet einseitigen Nutzen ohne Schädigung. Symbiose dagegen ist definiert als das Zusammenleben zweier unterschiedlicher Spezies zum gegenseitigen Nutzen. Ursprünglich wurde der Begriff Symbiose von Anton de Bary als „Besonders enge Beziehungen oder Biosysteme zwischen zwei Arten“ beschrieben (de Bary, 1878). Symbiosen können temporär, also von zeitlich begrenzter Dauer, oder permanent sein. Eine intrazelluläre Lokalisation des symbiontischen Partners, welcher ein als Endocytobiose bezeichneter Vorgang vorausgeht, wird als Endosymbiose bezeichnet. In besonders hohem Maße finden sich in der Natur symbiontische Beziehungen von Bakterien, welche mit tierischen und pflanzlichen Organismen sowie mit Pilzen assoziiert sein können. Für symbiontische Mikroorganismen liegt dabei der Nutzen vor allem in der Bereitstellung von Nährstoffen durch den Wirt, stabilen Milieubedingungen und dem Schutz vor konkurrierenden Organismen oder Pathogenen. Der Wirt profitiert dabei ebenfalls von bestimmten Stoffwechselleistungen des prokaryoten Symbionten.

Symbiosen haben im Verlauf der Evolution eine nicht zu unterschätzende Rolle gespielt. Alle eukaryoten Zellen sind, wie sie sich heute darstellen, aus endocytobiotischen Vorgängen entstanden. In heutiger Zeit sind Symbiosen, vor allem Endosymbiosen mit Bakterien, insbesondere von wirtschaftlicher Bedeutung.

Extra- wie intrazelluläre symbiontische Interaktionen mit Mikroorganismen können unterschiedlich stark ausgeprägt sein (Kap. 1.2). Sie reichen von relativ lockeren Assoziationen mit begrenzter Dauer und unspezifischen symbiontischen Partnern bis hin zur Ausbildung neuer Organe oder Organismen, welche durch Verschmelzung verschiedener Individuen im Verlauf ihrer Coevolution entstanden sind (Roth et al., 1988). Dieser als

Symbiogenese bezeichneter Vorgang wurde erstmals von Mereschowsky beschrieben (Mereschowsky, 1905). Aus dieser „Verschmelzung“ unterschiedlicher Organismen, welche durch die Endosymbiontentheorie charakterisiert wurde, sind alle rezenten eukaryoten Zellen hervorgegangen (siehe Kap. 1.2.2). Eine solche Coevolution ist dabei charakterisiert durch morphologische und physiologische Modifikationen, als auch durch genomische Veränderungen beider Partner (Palenik, 2002). In besonders starkem Ausmaß ist das bei den rezenten semi-autonomen Organellen eukaryoter Zellen, den Mitochondrien und Plastiden, zu beobachten.

In den folgenden Kapiteln soll näher auf die unterschiedlichen Symbiosen von Bakterien mit pflanzlichen und tierischen Partnern eingegangen werden. Ein besonderer Schwerpunkt liegt dabei auf den bakteriellen Symbiosen mit Pflanzen und Pilzen und den damit einhergehenden Modifikationen beider Partner. Des Weiteren wird die Entstehung der rezenten semi-autonomen Organelle näher beschrieben.

1.2 Evolution von Symbiosen

1.2.1 Von freilebenden Bakterien zu permanenten und obligaten

Endosymbionten

Symbiosen zwischen Prokaryoten und ihren verschiedenen Wirten können unterschiedlich stark ausgeprägt sein. Im einfachsten Falle sind freilebende Bakterien nur extrazellulär und mehr oder weniger unspezifisch an ihre Wirtszellen gebunden. Solche Interaktionen treten zum Beispiel dann auf, wenn in einem Ökosystem die beiden Symbiosepartner räumlich eng zusammenleben und während ihres Wachstums Substanzen exportieren, welche für die jeweils andere Zelle von Nutzen sind. Extrazelluläre Interaktionen von Bakterien an ihre Wirte können aber auch spezifisch sein, wie beispielsweise die Symbiosen zwischen Cyanobakterien wie *Nostoc sp.* und ihren verschiedenen pflanzlichen Wirten, oder den Interaktionen von Cyanobakterien mit eukaryoten Einzellern (Kap.1.3). Sind extrazelluläre Symbionten eng an die Wirtszellen assoziiert, werden sie auch als Epibionten bezeichnet (Stoebe und Maier, 2002). Diesen Symbiosen ist allerdings gemeinsam, dass beide Organismen ihre Eigenständigkeit behalten und zum Überleben nicht auf den jeweiligen Symbiosepartner angewiesen sind. Physiologische und morphologische Modifikationen kommen zwar vor, beinhalten jedoch nicht eine Veränderung auf genomischen Niveau.

Gemeinsam ist diesen Assoziationen auch, dass die bakteriellen Symbionten nicht an die Tochtergenerationen des Wirts weitergegeben werden, sondern in jeder Generation eine Neuinfektion bzw. Besiedlung durch die Symbiosepartner stattfinden muss.

Der nächste Schritt einer engen symbiontischen Beziehung ist häufig durch die intrazelluläre Lokalisation des bakteriellen Symbionten innerhalb des Wirtes gekennzeichnet. Diesem Stadium geht ein als Endocytobiose bezeichneter Prozess voraus, in welchem der Symbiont in einem der Phagocytose ähnlichen Vorgang von der Wirtszelle aufgenommen wird. Der Vorteil einer intrazellulären Lokalisation liegt in einem effektiveren Stoffaustausch zwischen den Symbiosepartnern und einem besseren Schutz der bakteriellen Symbionten. Solche Interaktionen finden sich in bestimmten Assoziationen von Cyanobakterien mit einzelligen Algen (Kneip et al., 2004), aber auch bei der Symbiose zwischen dem Cyanobakterium *Nostoc sp.* mit *Gunnera* oder der Rhizobien-Leguminosen-Symbiose. Dieses Symbiosestadium ist charakterisiert durch die Spezifität der Wirte für ihre jeweiligen Symbiosepartner. Dennoch behalten sowohl Wirt als auch Symbiont in diesem frühen endosymbiontischen Stadium ihre Autonomie, bakterielle Endosymbionten werden nicht an die Tochtergenerationen weitergegeben und genetische Veränderungen der Symbiosepartner kommen nicht vor.

Modifikationen auf genomischen Niveau kennzeichnen die weiteren Schritte endosymbiotischer Interaktionen (Hoffmeister und Martin, 2003). Diese Veränderungen betreffen vor allem die bakteriellen Symbionten. So kann es zum Verlust solcher Gene kommen, die für Proteine kodieren, welche für eine intrazelluläre Lebensweise nicht mehr essentiell sind. Hierzu zählen beispielsweise Proteine der Zellwandbiosynthese. Durch eine solche Reduktion der Endosymbionten erreicht die Symbiose einen obligaten und permanenten Status, da die intrazellulären Symbiosepartner nicht mehr freilebend existieren können und auf den Wirt und seine Stoffwechselleistungen angewiesen sind. Die Symbionten werden ab diesem Stadium von den Wirten direkt an die nächste Generation weitergegeben. Durch diese vertikale Transmission zur nächsten Generation kommt es zur Isolation der Endosymbionten vom Genpool der freilebenden Population. Infolgedessen treten weitere genetische Veränderungen auf, welche in „*Muller's ratchet*“ zusammengefasst und erklärt sind (Allen, 1996; Allen und Raven 1996). „*Muller's ratchet*“ beschreibt den Verlust von Genen durch deletierende Mutationen, welche sich in sexuell isolierten Populationen – insbesondere auch intrazelluläre Mikroorganismen – anhäufen. Weitere Effekte sind die Reduktion der Genomgröße und ein erhöhter A/T-Gehalt der DNA obligat intrazellulärer Symbionten.

Die nächsten Schritte endosymbiontischer Interaktion sind charakterisiert durch den Transfer von Genen vom Genom des Symbionten in das Wirtsgenom. Diese Vorgänge führten zu den rezenten Organellen wie den Plastiden und werden durch die Endosymbiontentheorie beschrieben.

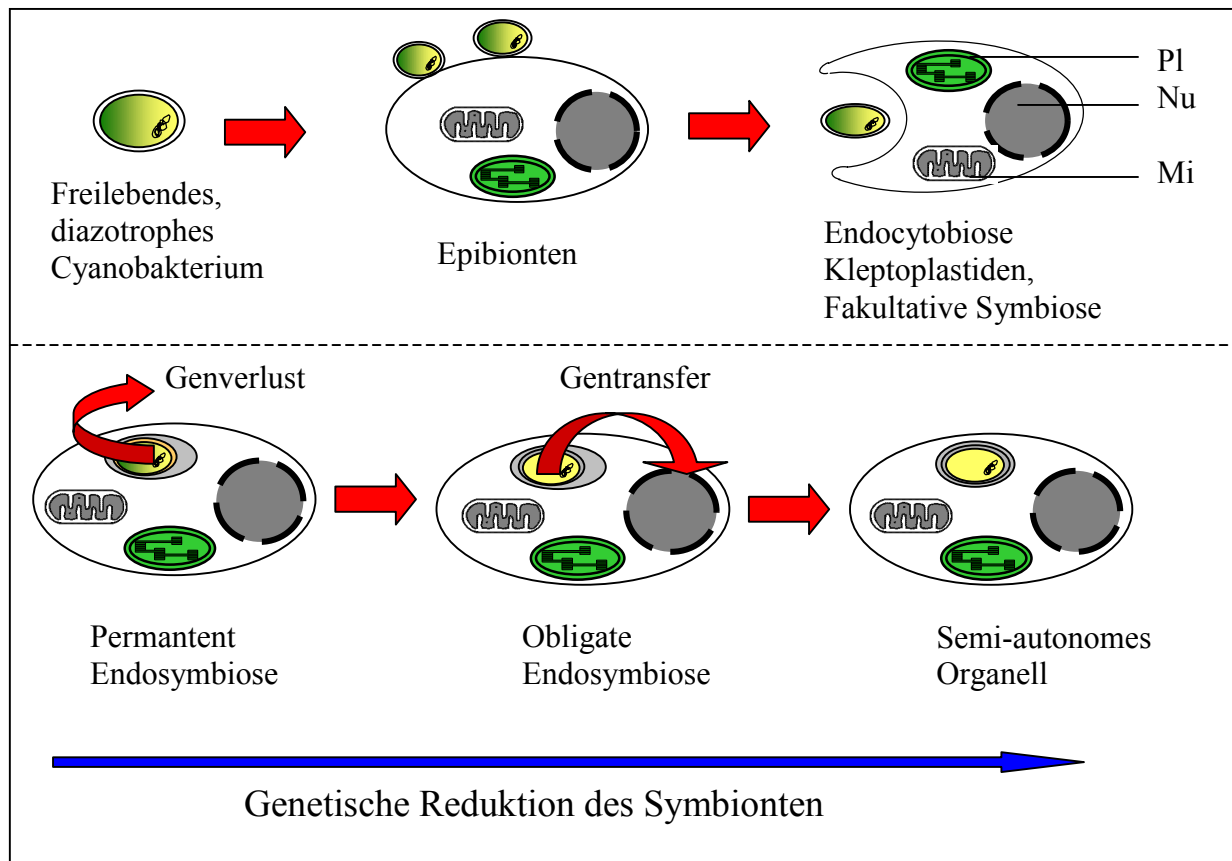


Abb. 1-1: Übergang von freilebenden Mikroorganismen zu intrazellulärer symbiontischer Lebensweise und Entstehung semi-autonomer Organelle. Beispielhaft ist die Symbiose eines diazotrophen Cyanobakteriums mit einem eukaryoten, photosynthetischen Wirt dargestellt. Pl: Plastide, Nu: Nucleus, Mi: Mitochondrium

1.2.2 Endosymbiontentheorie und Entstehung semiautonomer Organelle

Alle eukaryoten Zellen, wie sie sich heute darstellen, sind durch Verschmelzung verschiedener Organismen entstanden. Dieser Vorgang wird durch die Endosymbiontentheorie beschrieben und führte zu den rezenten semiautONOMEN Organellen der Eukaryoten, den Mitochondrien und Plastiden (Margulis et al., 1970; Gray, 1999).

Die Analyse mitochondrieller Genome deutet dabei auf einen α -proteobakteriellen Vorläufer hin, welcher mit einem Archea-artigen Wirt, der eventuell schon eukaryote Eigenschaften hatte, verschmolzen ist und dessen Genom im Verlauf der Evolution durch Genverlust und

Gentransfer immer weiter reduziert wurde (Attardi 1985; Bulmer 1987; Andersson et al. 1998; Martin und Muller 1998). Der Ursprung der Mitochondrien, vermutlich ein monophyletisches Ereignis, liegt über 1,5 Milliarden Jahre zurück (Martin et al., 2003). Die Hauptfunktion der Mitochondrien liegt in der ATP-Synthese durch oxidative Phosphorylierung, Mitochondrien sind aber noch an einer Vielzahl anderer Prozesse in der eukaryoten Zelle beteiligt.

Plastiden – die charakteristischen Organelle aller photoautotrophen Eukaryoten – entstanden durch Verschmelzung eines cyanobakteriellen Vorläufers mit einer eukaryoten, phagotrophen Wirtszelle (Bhattacharya und Medlin, 1995). Die Hauptfunktion dieser so genannten primären Plastiden liegt in der Photosynthese, der Umwandlung von Lichtenergie in chemische Energie und der daran gekoppelten Synthese von Kohlehydraten. Auch Plastideng Genome sind im Vergleich zu cyanobakteriellen Genomen stark reduziert, und die Mehrzahl der plastidären Gene wurden im Verlauf der Evolution in den Wirtsnucleus transferiert (Delwiche und Palmer, 1997; Martin und Hermann, 1998).

Aufgrund ihres bakteriellen Ursprungs weisen Plastiden und Mitochondrien viele gemeinsame Merkmale auf. Hierzu gehören die doppelte Hüllmembran sowie eine eigene Translationsmaschinerie mit bakteriellen 70S Ribosomen. In beiden Fällen liegen der symbiontischen Interaktion rein bakterielle Stoffwechselwege zugrunde, sowohl die ATP-Synthase als auch die Photosynthese-Komplexe wurden von Eukaryoten nur durch die endosymbiotische Assoziation erworben.

Gemeinsam ist den Organellen auch die starke genetische Reduktion durch Genverlust bzw. Gentransfer. Durch diese Prozesse wurde die endosymbiotische Assoziation etabliert und erreichte den rezenten semi-autonomen Status. Aufgrund der Tatsache, dass die Mehrzahl der Organellenproteine zwar im Wirtskern codiert und im Wirtscytoplasma translatiert werden, aber ihre Funktionen in den Mitochondrien bzw. Plastiden haben, müssen diese nach ihrer Synthese in die Organellen importiert werden. Hierzu tragen diese Proteine topogene Signale, welche für einen gerichteten Transport zu ihrem Wirkungsort kodieren.

Die Eigenschaften, welche die semi-autonomen Organellen von anderen obligaten und permanenten Endosymbionten abgrenzen, sind der massive Gentransfer vom Symbiont zum Wirtsnucleus sowie der gerichtete Rücktransport der reifen Proteine zum Organell.

In zahlreichen Algengruppen finden sich auch Plastiden, welche von mehr als zwei Hüllmembranen umgeben sind und daher als komplexe Plastiden bezeichnet werden (Maier et al., 2000). Komplexe Plastiden entstanden in einem als sekundäre Endocytobiose bezeichneten Vorgang, in dessen Verlauf ein photoautotropher Eukaryot, welcher bereits eine primäre Plastide besaß, von einer phagotrophen, eukaryoten Zelle aufgenommen wurde

(Gibbs, 1978, Kleinig und Maier, 1999, Stoebe und Maier, 2002). Zu Organismen mit komplexen Plastiden zählen beispielsweise die Cryptomonaden, die Haptophyten sowie die Heterokontophyten (Gibbs, 1979).

1.3 Bakterielle Symbiosen mit Pflanzen und Pilzen

Bakterien sind vielfach mit anderen Organismen symbiontisch assoziiert. Interaktionen finden sich mit Pflanzen aller phylogenetischen Gruppen, Protisten, aber auch mit unterschiedlichen Gruppen von Insekten, wie Blattläusen, Termiten und Fliegen. Tabelle 1 gibt einen Überblick über einige der bekannten Bakterien-Symbiosen und ihren Kennzeichen.

Wirt	Symbiont	Lokalisation	Funktion	Vertikale Transmission	Status der Symbiose	Genet Reduktion
Legumionosen/ <i>Parasponia</i>	<i>Rhizobium</i> , <i>Bradyrhizobium</i> <i>Azorhizobium</i>	Intrazellulär in Knöllchen	N ₂ - Fixierung	Nein	fakultativ	Nein
<i>Azolla</i> (Pteridophyta)	<i>Nostoc</i> sp.	Extrazellulär	N ₂ - Fixierung	Ja, über Megasporen	fakultativ	Nein
<i>Gunnera</i> (Angiospermae)	<i>Nostoc</i> sp.	Intrazellulär	N ₂ - Fixierung	Nein	fakultativ	Nein
Diatomeen	Cyanobakterien	Extrazellulär (innerhalb Frustula)	N ₂ - Fixierung	Ja, über Zellteilung	fakultativ	Nein
<i>Acythosiphon</i> (Aphidina)	<i>Buchnera</i> sp.	Intrazellulär	Aminosäure, Vitamin- Synthese	Ja, über Infektion der Eier	obligat	Ja
TseTse-Fliege (Glossina)	<i>Wigglesworthia</i> <i>glossinidia</i>	Intrazellulär	Aminosäure, Vitamin- Synthese	Ja, über Infektion der Larven	obligat	Ja

Tab. 1-1: Ausgewählte symbiontische Interaktionen von Bakterien mit verschiedenen eukaryoten Wirten

Unter den symbiontischen Beziehungen zwischen prokaryoten Zellen und Pflanzen hat die Rhizobien-Leguminosen Symbiose die wohl größte wirtschaftliche Bedeutung. In dieser intrazellulären Symbiose treten Bakterien der Gattung *Rhizobia* mit verschiedenen Pflanzen der Gattungen *Fabales*, *Fagales*, *Curcubitales* und *Rosales* in Wechselwirkung. Die Symbiose selbst ist gekennzeichnet durch eine Knöllchenbildung (Nodulation) an den Wurzeln der Wirtspflanze, in welchen die Symbionten lokalisiert sind. Diese als Bacteroide bezeichneten endosymbiontischen Rhizobien fixieren molekularen Stickstoff und stellen ihn als NH₃ gebunden dem Wirt zur Verfügung. Dadurch ist es den Wirtspflanzen möglich, auch

Böden zu besiedeln, welche arm an gebundenem Stickstoff sind. Im Gegenzug erhalten die Bacterioide Nährstoffe in Form von Dicarboxylsäuren und Spurenelementen (Udvardi et al., 1997).

Weitere Symbiosen zwischen Bakterien und Pflanzen bzw. Pilzen stellen die zahlreichen cyanobakteriellen Interaktionen dar. Die Cyanobakterien oder Cyanophyceen nehmen eine besondere Stellung in der Gruppe der Prokaryoten ein. Sie sind aerobe, phototrophe Organismen. Träger der Photosynthesepigmente sind intrazelluläre Membranen, die Thylakoide, wie sie auch in den Chloroplasten höherer Pflanzen vorkommen. Der Photosyntheseapparat der Cyanobakterien unterscheidet sich grundsätzlich von dem anderer photosynthetisch aktiver Prokaryoten. Sie enthalten beide Photosysteme I und II sowie Chlorophyll a. Phycobilliproteine wie Allophycocyanin, Phycocyanin und Phycoerythrin liegen den Thylakoiden als Phycobilisomen auf.

Die Vorläufer rezenter Cyanobakterien gelten als die Vorläufer der Plastiden von photosynthetisch aktiven Eukaryoten, welche durch primäre Endocytobiose erworben wurden oder in Form von komplexen Plastiden vorliegen.

Morphologisch finden sich sowohl unizelluläre Cyanobakterien als auch multizelluläre, filamentöse Formen. Viele Cyanobakterien besitzen zusätzlich zur Photosynthese die Fähigkeit der molekularen Stickstofffixierung mittels des Enzyms Nitrogenase (siehe Kap.1.5).

Cyanobakterielle Symbiosen sind für alle vier phylogenetischen Gruppen von Landpflanzen beschrieben worden. Interaktionen, vor allem der Gattung *Nostoc* sp., finden sich mit Angiospermen wie *Gunnera* (Bergman et al, 1992), Gymnospermen (Ow et al., 1999), Farnen wie *Azolla* (Hill, 1975) und Moosen (Meeks, 1990). Eine Besonderheit stellen die Symbiosen zwischen Cyanobakterien und Pilzen dar, welche zur Ausbildung von Flechten führen (Rai, 1990). Wie bei den zuvor beschriebenen Rhizobien wird auch bei cyanobakteriellen Symbiosen den Wirten fixierter Luftstickstoff zur Verfügung gestellt (Rai, 1990), die Ausprägung der Interaktionen zwischen Wirt und Symbiont sind allerdings sehr verschieden. So liegt nur bei der Symbiose zwischen *Nostoc* sp. und *Gunnera* eine intrazelluläre Interaktion der Symbionten vor, alle anderen bisher beschriebenen cyanobakteriellen Symbiosen mit Landpflanzen sind extrazellulär.

1.4 Cyanobakterielle Symbiosen mit Einzellern (Protisten)

Cyanobakterien sind nicht ausschließlich mit höheren Pflanzen und Pilzen vergesellschaftet, extra- wie intrazelluläre symbiontische Interaktionen unterschiedlicher Art finden sich auch mit einzelligen eukaryoten Organismen. Hierzu gehören intrazelluläre Assoziationen mit Kieselalgen (Diatomeen) (Geitler, 1977; Carpenter und Janson, 2000; Prechtel et al., 2004), Dinoflagellaten (Schnepf, 1992) und euglenoiden Flagellaten (Schnepf et al., 2002), sowie extrazelluläre Symbiosen mit verschiedenen anderen Protisten (Janson et al., 1999).

Solche cyanobakteriellen Interaktionen mit Protisten reichen von epibiontischen Assoziationen zu intrazellulären, aber temporären Wechselwirkungen. Modifikationen der Symbiosepartner auf genomischen Niveau wurden bisher nicht beschrieben. Die Hauptfunktion dieser Symbiosen ist – wie auch bei anderen Cyanobakterien-Assoziationen – die Fixierung von molekularem Stickstoff.

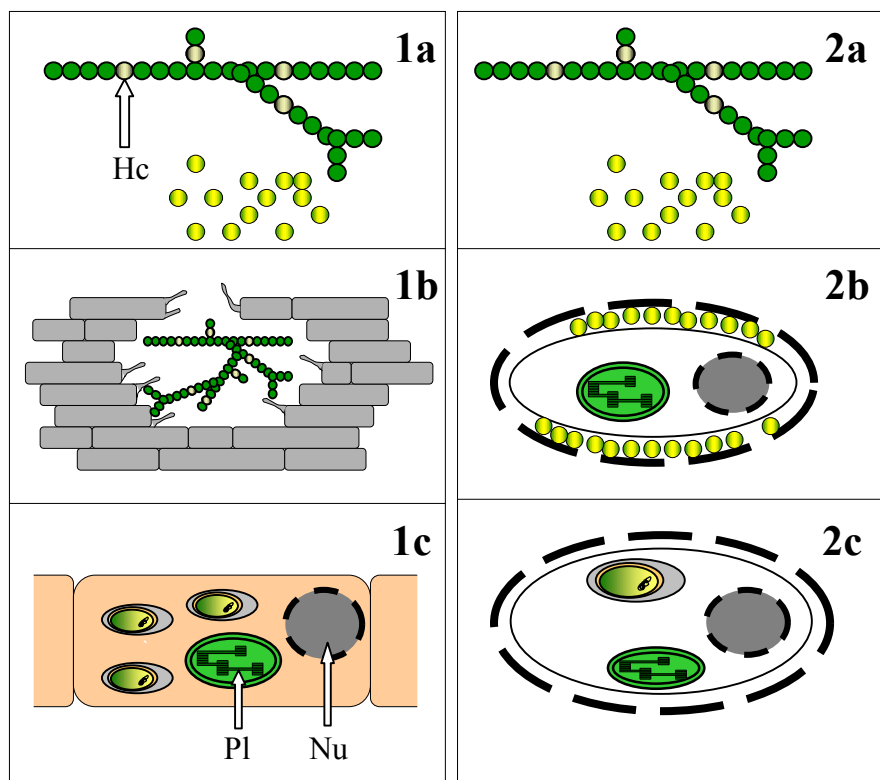


Abb. 1-2: Cyanobakterielle Assoziationen mit Pflanzen (1 a-c) und eukaryoten Einzellern (Protisten, 2 a-c): 1/2a: Freilebende filamentöse oder unizelluläre Cyanobakterien, 1/2b: Extrazelluläre epibiontische Assoziation in Blattaushöhlungen bei *Azolla* (1b) und zwischen Plasmamembran und Frustel (Zellwand) bei Diatomeen (2b), 1/2c: Intrazelluläre Assoziationen in Stielwarzenzellen bei *Gunnera* (1c) und in Diatomeen (2c). Hc: Heterocysten; Pl: Plastide; Nu: Nucleus.

1.5 Die symbiontische Stickstofffixierung

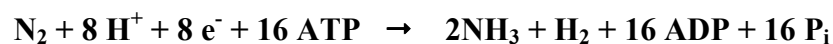
Stickstoff (N) ist Bestandteil der Aminosäuren und Nukleinsäuren und wird als wichtiger Nährstoff von allen Organismen für Entwicklung und Wachstum benötigt.

Die meisten pflanzlichen Organismen beziehen ihren Stickstoff gebunden in Form des Nitrat-Ions NO_3^- aus der Umgebung. Der Anteil an gebundenem Stickstoff ist jedoch in vielen Biotopen - vor allem auf landwirtschaftlich genutzten Flächen - vergleichsweise gering.

Einige Bakterien haben die Fähigkeit, molekularen Stickstoff aus der Luft zu fixieren, das heißt, N_2 in für den Organismus nutzbare Verbindungen umzusetzen. Zu diesen Bakterien gehören beispielsweise Rhizobien und Cyanobakterien, welche in verschiedenen symbiontischen Assoziationen den fixierten Stickstoff auch ihren Symbiosepartnern zur Verfügung stellen können.

Die Reduktion des molekularen Stickstoffs wird in allen stickstofffixierenden Bakterien von demselben Enzymkomplex, der Nitrogenase (auch Dinitrogenase), katalysiert.

Die Reaktion ist dabei eine stark Energie-abhängige Reduktion des molekularen Stickstoffs (N_2 oder Distickstoff) zu zwei Molekülen NH_3 :



In Form von NH_3 gebundener Stickstoff wird auf Glutamin übertragen und in anschließenden Reaktionen dem weiteren Stickstoffmetabolismus zugeführt (Abb. 1-3).

Die Nitrogenase ist aus zwei Haupt-Strukturkomponenten zusammengesetzt, welche als Nitrogenase-Reduktase und Nitrogenase bezeichnet werden (Hageman und Burris, 1978). Grundsätzlich handelt es sich bei den Nitrogenaseuntereinheiten um Metalloproteine, wobei je nach Bakterienart und Ionenangebot die Zusammensetzung der Nitrogenase-Untereinheit variieren kann. So unterscheidet man im Allgemeinen drei Typen von Nitrogenasen, welche als Metallkomponenten Eisen und Molybdän (Fe/Mo), Eisen und Vanadium (Fe/V) oder nur Eisen (Fe) enthalten (Bishop und Premakumar, 1992). Die häufigste Form des Enzyms, welche auch bei Cyanobakterien und Rhizobien vorkommt, ist der Fe/Mo-Typ.

Die Nitrogenase-Reduktase oder Azoverredoxin ist ein γ_2 -Homodimer und enthält pro Untereinheit je eine ATP-Bindestelle sowie eine einzelne $[4\text{Fe-4S}]$ -Gruppe (Georgiadis et al., 1992). In Bakterien ist diese Untereinheit durch das Gen *nifH* kodiert. Die Nitrogenase oder Molybdoferredoxin ist ein α_2/β_2 -Heterotetramer. Die alpha- und beta-Untereinheiten sind sich strukturell ähnlich und werden von den Strukturgenen *nifD* und *nifK* kodiert (Kim und Rees,

1992). Die Nitrogenase enthält zwei unterschiedliche Cofaktoren. Je zwei P-Cluster mit [8Fe-7S]-Komplexen zwischen den Untereinheiten, sowie je zwei FeMo-Cofaktoren mit [7Fe-9S]-Cluster, Molybdän und Homocitrat innerhalb der NifD-Proteine (Dean et al., 1993). An Synthese und Funktion der Nitrogenase sind zahlreiche weitere Proteine und Cofaktoren beteiligt, welche ebenfalls von *nif*-Genen kodiert werden. Gemeinsam ist allen *nif*-Genen, dass diese nur unter Stickstoff-fixierenden Bedingungen exprimiert werden.

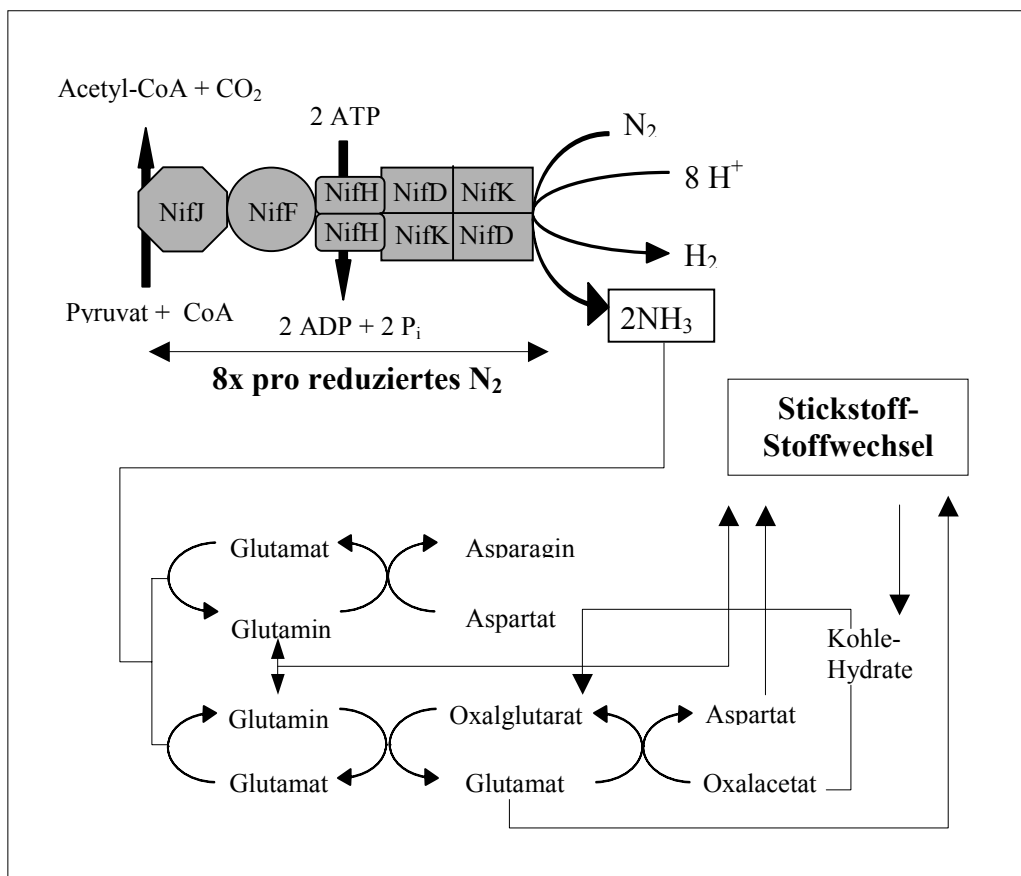


Abb. 1-3: Fixierung von molekularem Stickstoff durch Nitrogenase.

Dargestellt sind die wichtigsten Untereinheiten des Nitrogenase-Komplexes, die ATP-gekoppelte Reduktion des Distickstoffs und die Verwertung von gebildeten NH₃. NifJ: Pyruvat Flavodoxin/Ferredoxin Reduktase; NifF: Flavodoxin/Ferredoxin; NifH: Nitrogenase-Reduktase, NifD/NifK: Untereinheiten der Nitrogenase. Nähere Erläuterung siehe Text.

Das Enzym Nitrogenase ist sehr labil gegen Sauerstoff. Daraus ergibt sich das Problem, dass das Enzym von Sauerstoff aus der Umgebung als auch von Sauerstoff-bildenden Reaktionen wie der Photosynthese geschützt werden muss. Dieser Schutz der Nitrogenase wird auf verschiedene Art erreicht. So wird beispielsweise in filamentösen Cyanobakterien nur von

spezialisierten Zellen – den Heterozysten – Stickstoff fixiert (Wolk et al., 1994). Diese Zellen führen nur eine reduzierte Photosynthese durch und sind durch verdickte Zellwände von den Nachbarzellen getrennt (Murry und Wolk 1989). Eine solche räumliche Separierung findet sich auch bei symbiontischen Rhizobien innerhalb der Knöllchen. In unizellulären, sogenannten diazotrophen Cyanobakterien, sind sowohl Photosynthese als auch Nitrogenase-abhängige Stickstofffixierung in derselben Zelle lokalisiert. Hier findet eine zeitliche Trennung dieser beiden Stoffwechselwege statt, die Sauerstoff-bildenden Reaktionen der Photosynthese in der Hellphase, die Sauerstoff-verbrauchenden Reaktionen und die Stickstofffixierung in der Dunkelphase (Colón-López et al., 1997). Ein weiterer Schutzmechanismus ist die Bildung bestimmter Moleküle, welche O₂ abfangen und damit die Sauerstoffkonzentration niedrig halten (Hill et al., 1996; Wittenberg et al., 1972).

1.6 Phytoplankton und Diatomeen

Der Begriff Phytoplankton beschreibt eine polyphyletische Gruppe von einzelligen, photosynthetischen Organismen, welche in Salz- und Süßwasser leben (Falkowski und Raven, 1997). Man unterscheidet im Allgemeinen acht verschiedene Phyla innerhalb des Phytoplanktons, wobei die Bacillariophyta (Kieselalgen oder Diatomeen), die Dinophyta (Dinoflagellaten) und Foraminifera (Kammerlinge) die größten Gruppen darstellen.

Obwohl diese Organismen nur zirka 1 % der globalen photosynthetischen Biomasse ausmachen, gehören sie mit einem Anteil von 45 % an der globalen Primärproduktion zur Grundlage des Lebens auf der Erde (Field et al., 1998).

Diatomeen sind der Hauptbestandteil des marinen Phytoplanktons. Sie finden sich aber auch in fast allen Süßwasserhabitaten und in großer Zahl im Boden. Man unterscheidet zwischen 6000 und 12.000 Arten, welche in drei Klassen unterteilt werden, den *Coscinodiscophyceae*, *Fragilariophyceae* und den *Bacillariophyceae*. Charakteristischstes Merkmal dieser einzelligen Algen ist die Schale (Frustel) aus Siliziumoxid, welche die Zelle umgibt. Aufgrund ihrer Form werden zwei Typen von Diatomeen unterschieden, die sphärische (runde) und die pennate (stab-/bogenförmige) Form. Die Diatomeen gehören zur Gruppe der Heterokontophyten, welche im Verlauf der Evolution durch sekundäre Endocytobiose entstanden sind, indem ein phagotropher Eukaryot eine Rotalge aufgenommen und zu einer komplexen Plastide mit 4 Hüllmembranen reduziert hat (Abb.1-4; Gibbs, 1979).

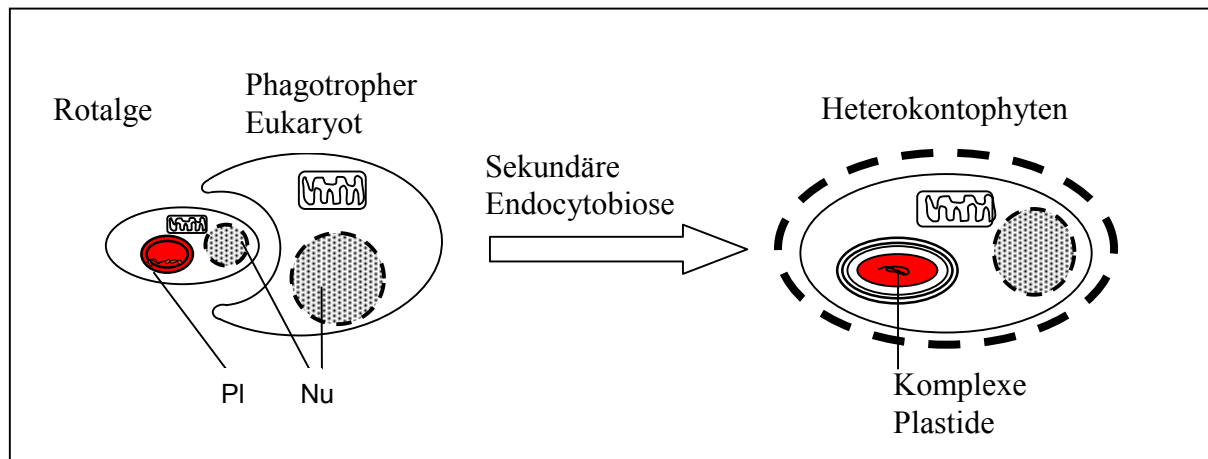


Abb. 1-4: Entstehung der Heterokontophyten durch sekundäre Endocytobiose (PI: Plastide, Nu: Nucleus)

1.7 *Rhopalodia gibba* und Sphaeroidkörper

Rhopalodia gibba ist eine motile Frischwasserdiatomee aus der Familie der *Epithemiaceae* (Klasse *Bacillariophyceae*). Man findet sie adhärent auf der Oberfläche von Wasserpflanzen sowie auf dem Gewässergrund, wo sie eine Schleimschicht ausbilden. Wie alle Diatomeen ist sie von einer Kieselsäureschale umgeben. Als photosynthetische Organelle besitzt *R. gibba* eine komplexe Plastide, welche von vier Hüllmembranen umgeben ist (Abb. 1-4). Pfitzer entdeckte bereits 1869 neben den herkömmlichen eukaryoten Kompartimenten und Organellen weitere cytoplasmatische Einschlüsse, welche er als „sphaeroidische Körper“ beschrieb (Pfitzer, 1869).

Vegetative *R. gibba*-Zellen enthalten in der Regel 4 Sphaeroidkörper, welche zentral in der Zelle angeordnet sind (siehe Abb. 1-5, A). Sie sind von ovaler Form, ihre Größe schwankt von 4-6 μm x 3-7 μm . Die Sphaeroidkörper sind von einer Doppelmembran umgeben, der innersten Membran ist eine dünne Mureinschicht aufgelagert, eine weitere Membran trennt sie vom Cytoplasma der Wirtszelle (Drum & Pankratz, 1965). Die Sphaeroidkörper weisen interne Membranstrukturen auf, welche den Thylakoiden der Cyanobakterien ähneln (siehe Abb. 1-5, B). Mit DNA-spezifischen Färbemethoden konnten die Sphaeroidkörper angefärbt werden. Drum & Pankratz folgerten aus diesen Beobachtungen, dass es sich um Organellen oder intrazelluläre Organismen handeln könnte, welche sie den Cyanobakterien zuordneten (Drum & Pankratz, 1965). Obwohl die Sphaeroidkörper morphologische Ähnlichkeiten zu Cyanobakterien aufweisen, fehlt ihnen aber die typische photosynthetische Pigmentierung.

Floener und Bothe zeigten über Acetylen-Reduktionstests, dass *R. gibba* Zellen zur Fixierung von molekularem Stickstoff fähig sind, ein Prozess, welcher auf prokaryote Zellen beschränkt ist (Floener & Bothe, 1980). Sie vermuteten, dass diese katalytische Leistung den Sphaeroidkörpern zuzuordnen sei. Weitere Untersuchungen zeigten, dass die Anzahl der Sphaeroidkörper mit sinkendem Stickstoffangebot zunehmen kann (deYoe et al., 1992). Ob die Sphaeroidkörper von *R. gibba* obligate Endosymbionten sind, und ob ihnen die Fähigkeit zur molekularen Stickstofffixierung zuzuordnen ist, konnte jedoch nicht eindeutig geklärt werden.

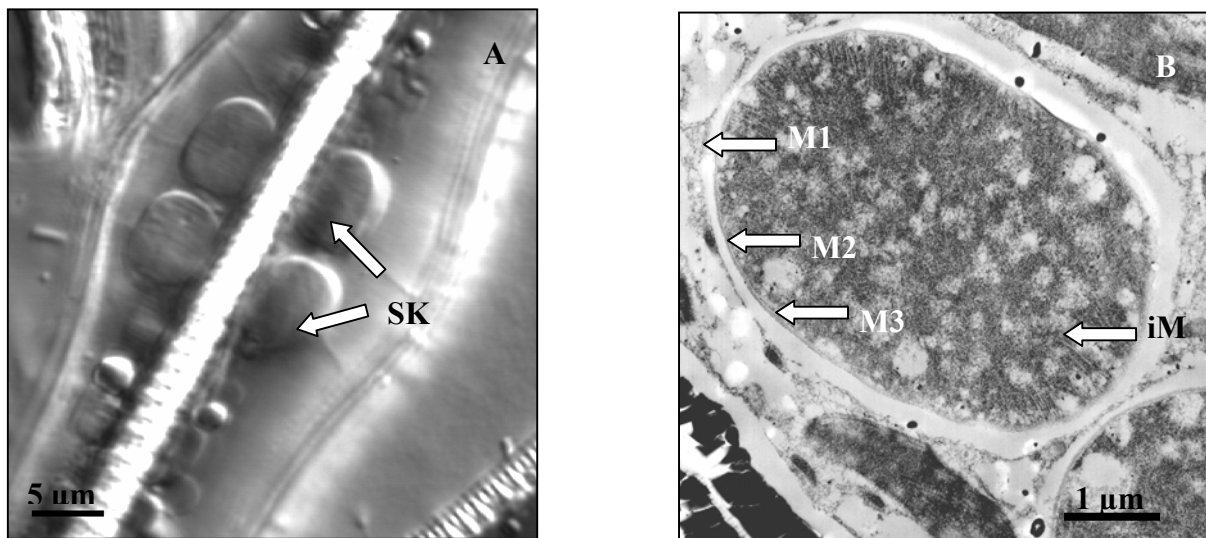


Abb. 1-5: A. *Rhopalodia gibba* mit Sphaeroidkörpern, B. Elektronenmikroskopische Aufnahme eines Sphaeroidkörpers. SK: Sphaeroidkörper, M1-3: Sphaeroidkörper-Membranen, iM: interne Membranen (aus Kneip, 2002)

1.8 Zielsetzung dieser Arbeit

Das Ziel dieser Arbeit lag in der näheren Charakterisierung der Sphaeroidkörper der Diatomee *Rhopalodia gibba*. Hierbei sollte durch molekularbiologische Methoden analysiert werden, ob Sphaeroidkörper DNA enthalten und es sich bei den beschriebenen intrazellulären Einschlüssen um endosymbiontische Bakterien handelt. Bei einem bakteriellen Ursprung sollte weiterhin aufgeklärt werden, ob die in Zusammenhang mit *Rhopalodia* experimentell festgestellte Nitrogenaseaktivität mit dem vorliegenden Diatomeen-Stamm reproduziert, und die Fähigkeit zur molekularen Stickstofffixierung den Sphaeroidkörpern als intrazelluläre Symbionten zugeordnet werden kann. Durch Stammbaumanalysen anhand sequenzierter Gene

sollten die Sphaeroidkörper phylogenetisch untersucht und verwandte Organismen identifiziert werden.

Bei einer Bestätigung der bakteriellen Natur sollte des Weiteren die endosymbiotische Interaktion der Sphaeroidkörper mit *Rhopalodia gibba* als Wirtszelle näher untersucht werden. Hierbei sollten vergleichende Sequenzinformationen von Sphaeroidkörper-DNA und DNA verwandter freilebender Bakterien dazu genutzt werden, genetische Modifikationen der Endosymbionten zu analysieren. Diese genetischen Untersuchungen sollten in Zusammenhang mit physiologisch-morphologischen Analysen Informationen über den Status der Endosymbiose liefern.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien

Hier nicht aufgeführte Chemikalien wurden von den Firmen Roth (Karlsruhe), Merck (Darmstadt) oder Sigma (München) bezogen.

Ampicillin	Boehringer, Mannheim
APS	Roth, Karlsruhe
Bromphenolblau	Serva, Heidelberg
Chloramphenicol	Serva, Heidelberg
CTAB	Roth, Karlsruhe
DNaseI	Boehringer, Mannheim
Ethidiumbromid	Roth, Karlsruhe
IPTG	Roth, Karlsruhe
2-Mercaptoethanol	Serva, Heidelberg
Percoll	Amersham Pharmacia, Freiburg
Phenol (wassergesättigt)	Roth, Karlsruhe
Phenol (TE-gepuffert)	Roth, Karlsruhe
Proteinase K	Boehringer, Mannheim
PMSF	Sigma, München
RNasin	Promega, Mannheim
SDS	Roth, Karlsruhe
TEMED	Roth, Karlsruhe
Tetracyclin	Sigma, München
X-Gal	Roth, Karlsruhe

2.1.2 Puffer und Lösungen

Die hier nicht aufgeführten Puffer und Lösungen wurden ausnahmslos angefertigt nach Sambrook et al. (1989).

10 x TBE	:	1,34 M	Tris/HCl, pH 8,8	
		0,44 M	Borsäure	
		25 mM	Na ₂ EDTA	
Ladepuffer (DNA)	:	0,1 % (w/v)	Bromphenolblau	
		0,1 % (w/v)	Xylencyanol	
		50 mM	Na ₂ EDTA	
		4 M	Harnstoff	
		50 % (w/v)	Saccharose	
PBS	:	140 mM	NaCl	pH 7,3
		2,7 mM	KCl	
		10 mM	Na ₂ HPO ₄	
		1,8 mM	KH ₂ PO ₄	
20xSSC, pH 7,0	:	3,0 M	NaCl	
		0,3 M	NaCitrat	
TE-Puffer, pH 8,0	:	10 mM	Tris/HCl pH8,0	
		1 mM	Na-EDTA	

2.1.3 Filter, Membranen und Säulen

Nitrocellulose	Roth, Karlsruhe
HybondN ⁺ Nylon	Amersham Pharmacia, Freiburg
Whatman 3MM	Schleicher & Schuell, Dassel
<i>NucTrap[®] Probe Purification Columns</i>	Stratagene, La Jolla USA

2.1.4 Radiochemikalien

[^{32}P]-dCTP wurde als Deoxycytidin 5'-[α - ^{32}P] triphosphat-triethylammoniumsalz von der Firma Amersham (Freiburg) bezogen. Die Aktivität der Lösung betrug 18.5 MBq bzw. 500 μCi pro 50 μl [^{32}P]-dCTP.

2.1.5 Photomaterialien

Agfaortho Negativfilm	Agfa Gevaert, Leverkusen
Scientia EM Film	Agfa Gevaert, Leverkusen
Photopapier Agfa BN310RC	Agfa Gevaert, Leverkusen
Entwickler Agfa Rodinal	Agfa Gevaert, Leverkusen
Fixierer Agfa Leukobrom	Agfa Gevaert, Leverkusen
Röntgenfilm RX Medical 18 x 24 cm	Fuji, Japan
Röntgenfilm-Entwickler	Kodak, Rochester (USA)
Röntgenfilm-Fixierer	Kodak, Rochester (USA)

2.1.6 Molekularbiologische Kits

<i>JETsorb DNA extraction kit</i>	GENOMED, Bad Oeynhausen
<i>Thermo sequenase fluorescent labelled primer cycle sequencing Kit with 7-deaza-dGTP</i>	Amersham Pharmacia, Freiburg
<i>TransformAID-Kit</i>	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
<i>CopyControlTM Fosmid Library Production Kit</i>	Epicentre, Madison, Wisconsin, USA
<i>DNA Terminator End Repair Kit</i>	Lucigen, Middleton, Wisconsin, USA
<i>pEZSeq Blue/White Cloning Kit</i>	Lucigen, Middleton, Wisconsin, USA
<i>RediprimeTM II Random Prime Labelling System</i>	Amersham Pharmacia, Freiburg
<i>PCR DIG Probe Synthesis Kit</i>	Roche Diagnostics, Mannheim

2.1.6.1 Enzyme

Restriktionsendonucleasen, DNA-Polymerasen und DNA-modifizierende Enzyme und Proteasen wurden von den Firmen Amersham Pharmacia (Freiburg), Boehringer (Mannheim), Eppendorf (Hamburg), Gibco/BRL (Eggenstein), Promega (Mannheim) oder Stratagene (Heidelberg) bezogen.

DNase I	(10 U/ml)
Lysozym	(20 mg/ml)
Proteinase K	(10 mg/ml)
RNase A	(5 mg/ml)
Taq DNA Polymerase	(5000 U/ml)
Pfu DNA Polymerase	(3000 U/ml)
T4 DNA Ligase	(1000 U/ml)

2.1.7 DNA-Längenstandards

DNA-Längenstandards wurden durch zweistündige Hydrolyse von 12,5 µg Lambda-DNA mit den Endonucleasen *EcoRI* und *HindIII* hergestellt (Endkonzentration 100 ng/µl). Desweiteren wurde für DNA-Agarosegele der 1kb-Marker der Firma MBI-Fermentas verwendet.

Als Größenstandards in Pulsfeldgelen diente T7-40kbp-Marker (Epicentre) sowie Lambda-DNA.

2.1.8 Oligonukleotide

Oligonukleotide wurden von der Firma MWG (Ebersberg) bezogen. Die Primer, die für die Sequenzierung mit dem LiCOR 4200 verwendet wurden, waren mit IRD800- (800 nm-Kanal) bzw. IRD700-Farbstoff markiert (700 nm-Kanal). Primer-Sequenzen sind in 5'→3'-Richtung angegeben.

<i>Name</i>	<i>Sequenz</i>	<i>Modifikation</i>
M13(-20) :	GTA AAA CGA CGG CCA GT	IRD700 oder IRD800
M13 reverse :	GGA AAC AGC TAT GAC CAT G	IRD700 oder IRD800

pCC1TM/

pEpiFOSTM RP-2 : GCC AAG CTA TTT AGG TGA G IRD800

Primer für spezifische Amplifikationen wurden ohne Modifikationen synthetisiert.

1) Primer für das *Screening* der Fosmidbibliotheken

SBnifD_uni :	CGG ACA AAG AAA ACG CAG AAT TTG
SBnifD_rev :	CAG AAC GTC ATC ACA CTG TTT TTG
CynifD_uni :	CCG TCA CGT TGT TCC TGC TTT C
CynifD_rev :	CCA AGG GGT GCC AAT TAA TCC C
F13A12/3_uni:	GAA CTC TAC AAT ACA GAT TAA CCG C
F13A12/3_rev:	CAC TAA TCC ATC TAG ATT AGC CAC T
F13A12/5_uni:	GGG CAT TCC AGA ATT AGA AGT AGG
F13A12/5_rev:	CTG TAG CCA AGC CAA AGT CGT TAT G
F4D10/5_uni :	CAA GCT GTC TTT GGA CAA AAG
F4D10/5_rev :	CGT TGA AGG TTT CCT CAA AAC
F4D10/3_uni :	GAT ATC GTT GAA ACC TAT CGA G
F4D10/3_rev :	GAA TGT TAG GAC GAG CAA AAG G

2) Primer zur Amplifikation bestimmter Gene

nifU_uni :	GGA GAA GTG GGT AGT ATT GCT TG
nifU_rev :	CAG AAA TGA CGA TTA ATT CTG G
nifUdeg_uni :	GGI GA(A/G) GTI GA(A/G) (A/T)(G/C)I ATI GCI TG(T/C) GGI G
nifU2_rev :	CTG CAA TGA CAG TTA ATT CTG GGG
nifUS_uni :	GCA ATC ACA ACC GGA GAA GTG GG
NifUS_rev :	CCA CAT CCA CCC CCT GCT TTG AC
nifUdegrev :	GC(G/A) CAI (G/C)(A/T)I CC(G/A) CAI GCI CC(C/T) TG
sigC_uni :	GA(C/T) ACI GTI GGI GCI TT(T/C) TT(T/C) AA(A/G) G
sigC_rev :	C IGT /A/G)TC (C/T) TC ICC (C/T)TT ICC IAC
recA_uni :	GA(A/G) ATI TA(C/T) GGI CCI GA(A/G)
recA_rev :	GG IGG IGC IAC (C/T)TT (A/G)TT
SK16S_u :	AGA GTT TGA TCA TGG CTC AG
SK16S_r :	AAG GAG GTG ATC CAA CCG CA
SKnifD_u :	CAC CAC ATT GCT AAC GA
SKnifD_r :	AAG AGT GCA TTT GAC GG
CyPetE_uni2 :	GCT ACT GTT GCT CTT GTT ATC TCC
CyPetE_rev2:	CAA TTA CCT TAC CAA CCA TGC CAG
Cyl0016_u :	CGA GAA CAA TGG CAA GTT TAA G
Cyl0016_r :	CGC TCA ATG CTG CTA TAT ATT AAG

16S_u	:	AGA GTT TGA TCA TGG CTC AG	
16S_r	:	AAG GAG GTG ATC CAG CCG CA	
16S-SK-biot	:	GCA CGG CTT GGG TCG ATA CAA	5'-biotinyliert

3) Primer zum Schließen von Lücken zwischen *Contigs* siehe Anhang (Kap. 7.3)

2.1.9 Antikörper

Mouse *anti*-Biotin IgG

Rabbit *anti*-mouse IgG Cy2

Rabbit *anti*- α Fe/Mo protein IgG

Goat *anti*-rabbit IgG *gold-coupled*

2.1.10 Vektoren

pUC19	Amp ^r , <i>lacZ'</i> ; <i>flori</i> ; geöffnet und dephosphoryliert (MBI Fermentas, St. Leon-Rot und Appligene, Heidelberg (Yanish-Perron, 1985))
pGEM-T	Amp ^r , <i>lacZ'</i> , P _{T7} , P _{SP6} , (Promega, Mannheim)
pCC1FOS TM	Chl ^r , <i>lacZ'</i> , <i>ori2</i> , <i>oriV</i> , P _{T7} , <i>loxP</i> , <i>cos</i> , <i>parA</i> , <i>parB</i> , <i>parC</i> (Epicentre, Madison)
pEZSeq TM	Amp ^r , <i>lacZ'</i> , <i>ori</i> (Lucigen, Middleton)

2.1.11 Bakterienstämme

<i>E. coli</i> XL1-Blue MRF'	Δ (<i>mcrA</i>)183 Δ (<i>mcrCB</i> - <i>hsdSMR</i> - <i>mrr</i>)173 <i>endA1</i> <i>supE44</i> <i>thi-1</i> <i>recA1</i> <i>gyrA96</i> <i>relA1</i> <i>lac</i> [F' <i>proAB</i> <i>lacIqZ</i> Δ M15 Tn5 (Kanr)]
EPI300 TM -T1R Phage T1-resistant <i>E. coli</i>	[F- <i>mcrA</i> Δ (<i>mrr</i> - <i>hsdRMS</i> - <i>mcrBC</i>) ϕ 80 <i>dlacZ</i> Δ M15 Δ <i>lacX74</i> <i>recA1</i> <i>endA1</i> <i>araD139</i> Δ (<i>ara</i> , <i>leu</i>)7697 <i>galU</i> <i>galK</i> λ - <i>rpsL</i> <i>nupG</i> <i>trfA</i> <i>tonA</i>]

Die Bakterien wurden gemäß den Anweisungen der Hersteller kultiviert.

Kompetente *E. coli* Zellen wurden unter Verwendung des *TransformAID-Kits* der Firma MBI Fermentas (St. Leon-Rot) oder nach Sambrook et al. (1989) hergestellt.

2.1.12 Kulturmedien

2.1.12.1 Medium für *E. coli*

LB-Medium (pro Liter):	10 g	Bacto-Trypton
	5 g	Bacto-Hefeextrakt
	10 g	NaCl
2xYT Medium (pro Liter):	16 g	Bacto-Trypton
	10 g	Bacto-Hefeextrakt
	5 g	NaCl
TB-Medium (pro Liter):	20 g	Bacto-Trypton
	10 g	Bacto-Hefeextrakt
	20 g	Glucose
Freezing-Medium (pro Liter):	10 g	Bacto-Trypton
	5 g	Bacto-Hefeextrakt
	10 g	NaCl
	36 mM	K ₂ HPO ₄
	13,2 mM	KH ₂ PO ₄
	1,7 mM	Na Citrate
	0,4 mM	MgSO ₄
	6,8 mM	(NH ₄) ₂ SO ₄
	4,4% v/v	Glycerol

Für die Herstellung von LB-Platten wurden 15 g Bacto-Agar pro Liter LB-Medium eingewogen. Nach Autoklavieren wurde bei einer Mediumtemperatur von zirka 50°C für selektive Medien Ampicillin (50-100 µg/ml Endkonzentration) beziehungsweise Chloramphenicol (12,5 µg/ml Endkonzentration) zugegeben. Für die Herstellung selektiver X-Gal-IPTG-Ampicillin-Platten wurde zusätzlich X-Gal und IPTG (Endkonzentration je 40 µg/ml) zugefügt.

2.1.12.2 Kultur-Medium und Wachstumsbedingungen für *Cyanothece* sp. ATCC 51142

Das Kulturmedium für *Cyanothece* sp. ATCC 51142 war wie folgt zusammengesetzt:

Spurenmetall-Stocklösung (1000 ×):	0,32 mM	$\text{CuSO}_4 \times 5 \text{ H}_2\text{O}$
	0,17 mM	$\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \times 6 \text{ H}_2\text{O}$
	46,3 mM	H_3BO_3
	4,15 mM	$\text{MnCl}_2 \times 4 \text{ H}_2\text{O}$
	1,61 mM	$\text{NaMoO}_4 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$
	0,77 mM	$\text{ZnSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$

Kultur-Medium 1047 MN Marine Medium (ATCC 957), pro Liter:

0,04 g	$\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$
0,02 g	$\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$
0,75 g	NaNO_3
0,02 g	$\text{K}_2\text{HPO}_4 \times 3\text{H}_2\text{O}$
3,0 mg	Zitronensäure
3,0 mg	Eisen-Ammonium-Citrat
0,5 mg	Na-EDTA
0,02 g	Na_2CO_3
1,0 ml	Spurenelemente 100x
250,0 ml	ddH ₂ O
750,0 ml	Seewasser

Es wurde 20 min autoklaviert, wobei bei Flüssigkulturen Eisenammoniumcitrat erst nach dem Autoklavieren hinzugegeben wurde.

Für optimales Wachstum wurde dem Medium nach dem Autoklavieren 20mg/L Vitamin B zugefügt.

2.1.12.3 Kulturmedium für *Rhopalodia gibba*

Das NO₃- Medium für die Anzucht wurde nach dem Rezept von Floener & Bothe (1980) angesetzt:

1) Stocklösungen (in ddH₂O):

7,08 g / 100 ml	Ca(NO ₃) ₂ 4 H ₂ O
0,517 g / 5 L	CaSO ₄ 2 H ₂ O
0,745 g / 100 ml	KCl
2,465 g / 100 ml	MgSO ₄ 7 H ₂ O
0,2923 g / 100 ml	NaCl
0,871 g / 100 ml	K ₂ HPO ₄
3,36 g / 100 ml	NaHCO ₃
5 g / 100 ml	Na ₂ SiO ₃
0,372 mg / 100 ml	Fe-EDTA

2) Spurenmittel-Stocklösungen (pro 100 ml ddH₂O)

		Pro 100 ml
		Spurenelementgesamtlösung
23,8 mg	CoCl ₂	0,02 ml
935 mg	Na ₂ B ₄ O ₇	2 ml
198 mg	MnCl ₂ 4 H ₂ O	2 ml
28,8 mg	ZnSO ₄ 7 H ₂ O	0,02 ml
25 mg	CuSO ₄ 5 H ₂ O	0,02 ml
24,2 mg	NaMoO ₄ 2 H ₂ O	0,2 ml
278 mg	FeSO ₄ (EDTA-Kompl.)	2 ml
372 mg	Na-EDTA	4 ml

3) Vitamin-Stocklösung

5,2 µM	Vitamin B ₁₂
25,6 nM	Vitamin B ₁
0,025 µM	Biotin

Das Kulturmedium von *Rhopalodia gibba* setzte sich wie folgt zusammen (Angaben in ml Stocklösung/Liter):

0,2 ml	Ca(NO ₃) ₂ 4 H ₂ O
20 ml	CaSO ₄ 2 H ₂ O
0,8 ml	KCl
1 ml	MgSO ₄ 7 H ₂ O
0,2 ml	NaCl
0,15 ml	K ₂ HPO ₄
1 ml	NaHCO ₃
3 ml	Na ₂ SiO ₃
0,5 ml	Fe-EDTA
1 ml	Vitamin-Stocklösung
5 ml	Spurenelementgesamtlösung

Die Phosphatsalze wurden separat autoklaviert. Der Eisen-EDTA-Komplex, die Vitamine und das Bicarbonat wurden sterilfiltriert nach dem Autoklavieren zugegeben.

2.1.13 Geräte

PCR-Thermocycler

MasterCyclerGradient (Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg)
Biomed Thermocycler (Bachofer, Reutlingen)
Primus Gold (MWG, Ebersberg)

Sequenziermaschinen

ALFexpress (Amersham Pharmacia, Freiburg)
LiCOR 4200 (MWG, Ebersberg)

Zentrifugen

Centrifuge 5417R und 5417C (Eppendorf-Netheler-Hinz, Hamburg)
GP Centrifuge (Beckman)
Labofuge 400R (Heraeus Instruments, Hanau)
RC-5B Refrigerated Superspeed (Sorvall, Bad Homburg)
Sepatech Biofuge 17RS (Heraeus Instruments, Hanau)

Sonstige Geräte

BioRAD GelDoc (BioRad, München)
Expositionskassetten (Appligene, Heidelberg)
Gaschromatograph Varian Modell 3380 (Varian, Palo Alto, USA)
Hybridisierungsofen (Bachofer, Reutlingen)
Konfokales Laser Scanning Mikroskop (Leica)
Mikrotom Ultracut (Reichert-Jung, Wien)
Power Supply (LKB, Bromma)
Pulsfeldgerät Chef-DRIII Variable Angle System (Biorad, München)
Repro-Anlage Leitz Focomat Ilc (Leica)
Spektralphotometer Ultrospec II (Pharmacia, Freiburg)
Transmissions Elektronenmikroskop EM301 (Philips, Hamburg)
UV-Lampe MinUVIS 254 nm/366 nm (DESAGA, Heidelberg)
Ultraschall-Wasserbad Lehfeld

2.1.14 Software

Zur automatischen Erstellung von Alignments wurde ClustalX (Jeanmougin et al., 1998) sowie Genedoc (Nicholas et al., 1997) verwendet.

Für die Bearbeitung der Sequenzierungen und die Erstellung von Contigs wurde das Programm Sequencher sowie das Programm Clone Manager 5 (*Scientific & Educational Software*) verwendet.

BlastX, BlastN	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/BLAST
BlastX, BlastP	http://blast.genome.ad.jp/
Blast 2 sequences	http://129.237.147.182/blast/wblast2_cs.html
ChloroP	http://www.cbs.dtu.dk/services/ChloroP/
CyanoBase	http://www.kazusa.or.jp:8080/cyano/index.html
Expasy	http://www.expasy.ch/
G/C-Content	http://www.artsci.wustl.edu/~twest/molbio/gccontent.php
tRNA-scan	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html
orf finder	http://www.genetics.wustl.edu/eddy/tRNAscan-SE/

2.2 Methoden

2.2.1 Kultur von Algen und Cyanobakterien

2.2.1.1 Kultur von *Cyanothece* sp. ATCC 51142

Cyanothece sp. ATCC 51142 wurde bei 26°C mit 170 rpm schüttelnd kultiviert. Die Lichtintensität bei Standardbedingungen betrug 1360 lx. 100ml Kultur wurde in 250 ml Erlenmeyerkolben ohne Schikane angezogen.

2.2.1.2 Kultur von *Rhopalodia gibba*

Rhopalodia wurde in 1 Liter Fernbach-Flachkolben bei 25°C und einem Hell/Dunkel-Rhythmus von 12/12 Stunden kultiviert.

Zum Ernten wurden die am Boden der Kulturflasche anhaftenden Zellen mittels eines Silikonrührfisches abgelöst. Die Suspension wurde dann 10 min bei 3.000 rpm abzentrifugiert und das Pellet sofort weiterverarbeitet.

2.2.2 Generelle molekularbiologische Methoden

Grundlegende molekularbiologische Methoden wurden, wenn nicht anders angegeben, nach Sambrook et al. (1989) durchgeführt.

2.2.2.1 Plasmidisolation aus *E. coli*

Für die Isolierung von Plasmiden aus den verwendeten *E. coli*-Stämmen wurde die Methode der Alkalischen Lyse (Birnboim und Doly, 1979) verwendet.

Von Übernachtskulturen von *E. coli* wurden 1,5 ml bei 14.000 rpm und 4 °C 1 min zentrifugiert. Das Pellet wurde in 200 µl Puffer P1 resuspendiert. Nach Zugabe von 200µl Puffer P2 wurde die Suspension vorsichtig geschwenkt und maximal 5 min bei RT inkubiert. Danach wurden 200 µl Puffer P3 sowie 20µl Chloroform zugegeben, geschüttelt, und die Suspension zur Fällung der Proteine für 5 min auf Eis inkubiert. Nach Zentrifugation bei 14.000 rpm, 4°C, für 20 min wurde der Überstand abgenommen und die DNA durch Zugabe

von 0,7 Vol Isopropanol bei RT gefällt. Nach einem Waschschriff mit 70%igem Ethanol wurde das DNA-Pellet getrocknet und anschließend in 40 µl ddH₂O aufgenommen.

P1:	50 mM	Tris/Cl, pH 8,0
	10 mM	EDTA
	100 µg/ml	RNase A
	Lagerung bei 4°C	
P2:	200 mM	NaOH
	1 %	SDS
	Lagerung bei RT	
P3:	3 M	KOAc, pH 5, 5
	Lagerung bei 4°C	

Für die Isolierung hochreiner Plasmid-DNA wurde ein Kit der Firma Qiagen (Hilden) nach Angaben der Hersteller verwendet.

2.2.2.2 Isolierung von Fosmid-DNA

Zur Isolierung von Fosmid-DNA wurden Klone in 5 ml LB-Medium mit 12,5 µg/ml Chloramphenicol über Nacht bei 37°C inkubiert. Mit 0,5 ml dieser Startkultur wurden 4,5 ml 2xYT Medium mit 12,5 µg/ml Chloramphenicol und 5µl CopyControlTM Induction Solution für 5 h bei 37°C und guter Durchlüftung schüttelnd inkubiert.

Nach 5 h wurden 5 ml Kultur bei 14.000 rpm 1 min abzentrifugiert. Das Pellet wurde wie in Kapitel 2.2.2.1 für Plasmide beschrieben weiterbehandelt, wobei jeweils 300 µl Puffer verwendet wurde. Zur Elimination von Kontaminationen durch genomische DNA wurde die Probe nach der Zugabe von P3 und Chloroform 1 h bei -80°C inkubiert und dann weiterverarbeitet. Die DNA-Pellets wurden nach Ethanol-Waschung für 15 min luftgetrocknet und in 50-100 µl ddH₂O aufgenommen.

2.2.2.3 Isolierung genomischer DNA aus *Cyanotheca* sp. ATCC51142

Die Isolierung genomischer DNA fand abgewandelt nach einem Protokoll von Smart und McIntosh (1991) statt. Nach Zentrifugation von 2-4 ml *Cyanotheca*-Kultur für 1 min bei 14000 rpm wurde das Pellet in 400 µl TE (pH 8.0) resuspendiert. Der Zellsuspension wurden 200 µl Glasperlen, 8 µl 10% SDS, 16 µl 5% SLS und 400 µl TE- gesättigtes Phenol zugegeben und 3×10 sek gevortext. Die Suspension wurde bei 12.000 rpm bei RT für 10 min zentrifugiert. Die wässrige Phase wurde in ein neues Gefäß überführt und zweimal hintereinander eine Extraktion mit Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol im Verhältnis 25:24:1 durchgeführt.

Durch Zugabe von 1/10 Vol 3 M NaOAc und 2 Vol abs. Ethanol (eiskalt) wurde die DNA 2 h bei -20°C gefällt. Durch Zentrifugation (14.000 rpm/ 4°C /20 min) wurde die DNA pelletiert, in 70 % Ethanol gewaschen, maximal 5 min getrocknet und in 20 µl bidest aufgenommen.

Durch Gelelektrophorese wurde die DNA-Isolierung überprüft.

2.2.2.4 Isolierung genomischer DNA aus Spaeroidkörpern von *Rhopalodia gibba*

Die Isolation erfolgte wie die in Kap. 2.3.4.4. beschriebene DNA-Isolierung aus *Cyanotheca*-Zellen.

2.2.2.5 Isolierung genomischer DNA aus *Rhopalodia gibba*

Rhopalodia Gesamt-DNA wurde mittels der CTAB-Extraktionsmethode isoliert und aufgereinigt (Murray und Thompson, 1980). 1 Liter Kultur wurde geerntet und bei 1000 x g für 10 min abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 2 ml Puffer B resuspendiert und bei -80°C in flüssigem Stickstoff gemörsert. Der Aufschluss wurde mit 1/5 Vol. 62°C heißem CTAB (10% in Puffer B) gemischt und für 1 h bei 60°C inkubiert. Danach erfolgte die Abtrennung von Zelltrümmern durch Zentrifugation für 10 min bei 10.000 rpm. Der Überstand wurde 2x mit je 1 Vol. PCI versetzt, gemischt und 10 min bei 10.000 rpm zentrifugiert. Die DNA in der oberen Phase wurde mittels EtOH-Präzipitation pelletiert, gewaschen, 15 min luftgetrocknet und in 20 µl TE-Puffer aufgenommen.

Puffer B:	100 mM	Tris/HCl , pH 8,0
	10 mM	EDTA, pH 8,0
	0,7 M	NaCl

2.2.2.6 Transformation von *E. coli* XL1Blue MRF'

Die Transformation wurde mit dem *TransformAID-Kit* (MBI Fermentas, St. Leon-Rot) nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

2.2.3 Isolation von Sphaeroidkörpern aus *Rhopalodia gibba*

8-12 L Kultur von *Rhopalodia gibba* wurden mit Hilfe eines Silikon-Rührfisches geerntet. Nach mehreren Zentrifugationsschritten bei 3.000 rpm wurde das Pellet in 2-4 ml Isolationsmedium mit DNaseI (5mg/ml, 1:1.000) aufgenommen. Die Zellen wurden mit einem Homogenisator bei 4°C aufgebrochen. Zum vollständigen Aufbruch der Zellen wurde 6 mal je 5 min homogenisiert. Der Zellaufschluß wurde mikroskopisch kontrolliert. Danach wurde die Lösung mit Isolationsmedium auf 120 ml verdünnt und für 2-3 min bei 100 x g und 10°C zentrifugiert, um intakte Zellen und große Zelltrümmer sowie Reste der Kieselschale abzutrennen. Der Überstand wurde erneut zentrifugiert (5.000 rpm, 5 min) und das Pellet in insgesamt 1-2 ml Gradientenmedium aufgenommen. Die Suspension wurde dann auf einen 4-stufigen Percollgradient (20%, 50%, 60%, 70%) geladen und 15 min bei 9500 rpm zentrifugiert. Die intakten Sphaeroidkörper sedimentierten vor allen an der 70%/60% Phasengrenze (Fraktion 4) und innerhalb der 60% Phase (Fraktion 3).

Die Phasen wurden vorsichtig abgenommen und mit je 1 ml Gradientenmedium gewaschen. Zur weiteren Aufreinigung wurden die Fraktionen mehrmals über je 1 ml 60% Percollkissen gewaschen. Das Pellet wurde in 50 µl TE-Puffer pH 8,0 aufgenommen und bis zur weiteren Verarbeitung bei -20°C gelagert.

Isolationsmedium:	330 mM	Sorbitol
	20 mM	MOPS
	13 mM	Tris-Base
	3 mM	MgCl ₂
	0,1 % (v/v)	BSA

Waschpuffer (1 x HMS):	330 mM	Sorbitol
	50 mM	HEPES/KOH pH 7.6
	3 mM	MgCl ₂

2.2.4 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Für die Polymerase-Kettenreaktion wurden Enzyme und zugehörige Puffersysteme von Eppendorf (Hamburg), MBI Fermentas (St. Leon-Rot) oder Amersham Pharmacia (Freiburg) verwendet. Annealingtemperaturen, Elongationszeiten und MgCl₂-Konzentrationen wurden nach Anforderungen der Primer, der eingesetzten DNA und der Größe des zu erwartenden Amplifikats verändert.

Ein Standard PCR-Ansatz wurde in einem Endvolumen von 25 µl mit Endkonzentrationen von 2-6 mM MgCl₂, 1 x Reaktionspuffer, je 0.25µM Primer, 10mM dNTPs und 1 U *Taq*-DNA-Polymerase durchgeführt. Es wurde eine DNA-Menge von 50ng bis 150ng DNA eingesetzt.

PCR-Produkte wurden zur Klonierung und Sequenzierung ausgeschnitten und durch Elution aus Agarosegelen (*JETSORB*, Bad Oeynhausen) gereinigt, in den T-Überhangsvektor pGEM-T einligiert (Promega, Mannheim) und anschließend in kompetente *E. coli* XL1 Blue MRF'-Zellen transformiert. Die Selektion positiver Transformanten erfolgte auf IPTG/X-Gal/Amp-Platten. Es folgte die Isolierung der rekombinanten Plasmide durch die in Kap. 2.2.2.1 beschriebene Methode. Anschließend wurden die Klone durch Restriktionsanalyse und Sequenzierung überprüft (siehe Kap. 2.2.5).

2.2.5 DNA-Sequenzierung

In Sequenziervektoren klonierte DNA wurde mit dem Kit „*Thermosequenase fluorescent labelled primer cycle sequencing Kit with 7-deaza-dGTP*“ der Firma Amersham Pharmacia (Freiburg) und Fluoreszenz-gelabelten Oligonucleotiden (MWG, Ebersberg) sequenziert.

2.2.5.1 Das LICOR System

Für den LICOR-Sequenzierautomaten (MWG, Ebersberg) wurden IRD700- bzw. IRD800-markierte Sequenzierprimer verwendet. Pro 1000 bp zu sequenzierender DNA (einschl.

Plasmid) wurden 150 ng eingesetzt, auf 11 µl mit destilliertem Wasser aufgefüllt und mit 1 µl Primergemisch (IRD700-markiertem Sequenzierprimer, 2 µM und IRD800-markiertem Sequenzierprimer, 4 µM) versetzt. Je 3 µl dieses Gemisches wurden zu je 1 µl der einzelnen Nucleotid-spezifischen Terminationslösungen gegeben. Die Reaktionslösungen wurden mit Öl überschichtet und 30 Zyklen aufeinanderfolgender Denaturierungs- (30 s), Annealings- (30 s) und Elongationsphasen (30 s) unterzogen. Nach der Sequenzierreaktion wurde jedem Ansatz 2 µl eines formamidhaltigen Ladepuffers (*formamide loading dye*, Amersham Pharmacia, Freiburg) zugesetzt.

2.2.6 Analyse fluoreszenzmarkierter DNA-Stränge durch Sequenzier-automaten

Die Analyse der erstellten Sequenzierreaktionen erfolgte auf dem LICOR4200 Sequenzierautomaten mit Hilfe eines Acrylamid-Gels basierend auf eine 40 %ige *Rapid gel* XL Stocklösung der Firma Amersham Pharmacia (Freiburg). Die Gelmatrix für die Separation der DNA-Fragmente setzte sich wie folgt zusammen:

Gelmatrix (LICOR4200):	12,6 g	Harnstoff
	3,5 ml	Rapid Gel XL (40%; Amersham Pharmacia)
	3 ml	10 x TBE- <i>Long-run</i> -Puffer
	210 µl	APS (10 %)
	45 µl	TEMED
	add 18 ml ddH ₂ O	

10 x TBE-<i>Long-run</i>-Puffer:	1,34 M	Tris/HCL pH 8,8
	0,45 M	Borsäure
	25 mM	EDTA

APS und TEMED wurden erst nach Entgasen der übrigen Komponenten hinzugegeben und dann das 0,2mm dicke Gel im Gelgießstand der Firma MWG (Ebersberg) nach deren Anleitung gegossen.

2.2.7 Auswertung der Sequenzen

Die Auswertung der Sequenzen wurde mit dem Computerprogramm ‚Sequencher‘ der Firma GeneCodes (USA) durchgeführt. Die Chromatogramme der einzelnen Sequenzen ermöglichten ein Korrekturlesen. Das Programm bot auch die Möglichkeit zur Auffindung einzelner Restriktionsschnittstellen und offener Leserahmen sowie die Bildung von *Contigs* (*contiguous sequence*) aus Klonen mit überlappenden Sequenzen.

Zum Vergleich mehrerer Sequenzen konnte ein Alignment durchgeführt werden, um mögliche Fehler in der Sequenz zu ermitteln und die Position der sequenzierten Fragmente zu bestimmen.

2.2.8 Herstellung von Fosmid-Bibliotheken

Fosmid-Bibliotheken genomischer DNA von Sphaeroidkörpern und *Cyanothece* sp. ATCC 51142 wurden mit Hilfe des *CopyControlTM Fosmid Library Production Kit* (Epicentre) nach Angaben des Herstellers generiert.

Hierzu wurde genomische DNA nach Standardprotokollen isoliert und aufgereinigt. Die gDNA wurde dann durch mehrfaches Pipettieren bis zu einer durchschnittlichen Fragmentgröße von 40-50 kbp physikalisch geschert. Die Größe der gDNA Fragmente wurde durch Pulsfeldgelelektrophorese überprüft. DNA-Fractionen geeigneter Größe wurden für die weitere Herstellung der Bibliotheken verwendet.

2.2.8.1 End-Repair von Insert-DNA

Gescherte DNA-Fractionen wurden zur Herstellung von *blunt-end* Fragmenten enzymatisch *end-repaired*. Hierzu wurden die im *CopyControlTM Fosmid Library Production Kit* (Epicentre) enthaltenen Komponenten verwendet.

32 µl	ddH ₂ O
8 µl	10x End-Repair-Puffer
8 µl	2,5 mM dNTP Mix
8 µl	10 mM ATP
20 µl	Gescherte Insert DNA (ca. 40kbp, 0,2µg/µl)
4 µl	<u>End-Repair Enzym Mix</u>
80 µl	gesamt

Der Ansatz wurde 45 min bei RT inkubiert. Die Reaktion wurde dann durch Zugabe von 15 µl DNA-Ladepuffer und Inkubation für 10 min bei 70°C gestoppt.

2.2.8.2 Größenfraktionierung von DNA durch Pulsfeldgelelektrophorese (PFGE)

Für die Herstellung der Fosmid-Bibliotheken musste die Insert-DNA eine Größe von ca. 40 kbp aufweisen, um eine maximale Ligations- und Transformationsrate zu erzielen.

Enzymatisch hergestellte *blunt-end* Insert-DNA wurde mittels Pulsfeldgelelektrophorese aufgetrennt.

Die Pulsfeldgelelektrophorese dient der Auftrennung sehr großer DNA-Moleküle bis hin zu ganzen Chromosomen (Schwartz und Cantor, 1984). Im Unterschied zur herkömmlichen Elektrophorese wechselt bei der PFGE der Stromfluss periodisch (*Switch-Time*) in einem Winkel von 90° bis 180°.

Für eine optimale Auftrennung im Bereich von 40 kbp wurde ein 1 % Agarosegel mit 0,5 x TBE und als Laufbedingungen 6-9 Volt/cm, eine konstant ansteigende *Switch-Time* von 1 bis 6 Sekunden über 11 h Laufzeit und ein Winkel von 120°C verwendet. Der Gellauf fand in 0,5 x TBE bei 14°C statt. Als Größenmarker diente ein T7 DNA Marker (Epicentre) für 40 kbp und Lambda-DNA für den Bereich > 50 kbp, welche in einer Konzentration von 50 ng eingesetzt wurden.

Zur späteren Elution der DNA wurde der Bereich des Gels, in welchem nach der Gelelektrophorese DNA der gewünschten Größe vorliegen sollte, vor dem Gellauf ausgeschnitten und mit 1% Low Melting Point Agarose (0,5 x TBE) aufgefüllt.

2.2.8.3 Elution von Insert-DNA aus PFGE-Agarosegelen

Zur Elution der Insert-DNA aus Pulsfeldgelen wurden die Komponenten aus dem *CopyControlTM Fosmid Library Production Kit* (Epicentre) verwendet. Um eine UV-Bestrahlung der Insert-DNA zu vermeiden, wurden die Gele nach der Elektrophorese auseinander geschnitten, die äußeren Markerspuren 30 min mit Ethidiumbromid angefärbt und danach 30 min in 0,5 x TBE entfärbt. Die Markerbanden wurden durch UV-Bestrahlung sichtbar gemacht und mittels Whatman-Filtern markiert. Danach wurden die Markerspuren wieder an das Agarosegel mit Insert-DNA gelegt und anhand der Filter-Markierungen der Bereich von 40 kbp bis ca. 45 kbp aus den Proben-Spuren ausgeschnitten.

Zur Elution wurden die Gelstücke gewogen, für 15 min bei 70°C und dann bei 45°C inkubiert. Nach Zugabe von 50x GELase Puffer zu 1x Endkonzentration und 1U GELase Enzym pro 100µl Agarose wurde der Ansatz für 1 h bei 45°C inkubiert, die Reaktion wurde anschließend durch Inkubation für 10 min bei 70°C gestoppt.

Die Ansätze wurden auf Eis gekühlt und Agarosereste durch Zentrifugation für 20 min bei 10.000 rpm und 4°C abgetrennt. Die DNA aus dem Überstand wurde mittels Ethanol-Präzipitation pelletiert, gewaschen und in 5-10 µl TE-Puffer aufgenommen.

2.2.8.4 Fosmid-Ligation und Phagen-Transduktion von *E. coli* EPI300-T1^R

Die Ligation der Insert-DNA fand nach den Angaben des Herstellers mit Komponenten des *CopyControl*TM Fosmid Library Production Kit (Epicentre) statt.

1 µl	10x Fast-Link Ligation Buffer
1 µl	10 mM ATP
1 µl	CopyControl pCC1FOS Vektor (0,5 µg/µl)
6 µl	Insert-DNA (ca. 0,2 µg/µl)
1 µl	<u>Fast-Link DNA Ligase</u>
10 µl	gesamt

Ligationen wurden für 2 h bei RT inkubiert und die Reaktion durch Inkubation für 10 min bei 70°C gestoppt.

Die Transduktion von *E.coli* EPI300-T1^R Zellen wurde nach Angaben des Herstellers mit *MaxPlax Lambda Packaging* Extrakts (Epicentre) durchgeführt.

Nach der Infektion wurden die Bakterien auf LB-Agar-Platten mit 12,5 µg/ml Chloramphenicol ausplattiert und für 24 h bei 37°C inkubiert.

Zur Vereinzelung der Klone wurden die Kolonien mit sterilen Zahnstochern gepickt, in 96-Loch-Mikrotiterplatten mit je 150 µl *Freezing-Medium* überführt, für 24 h bei 37°C inkubiert und danach bei -80°C gelagert. Nicht vereinzelte Klone wurden mit *Freezing-Medium* von den Platten abgespült, vereinigt, in Aliquots aufgeteilt und bei -80°C gelagert.

2.2.9 *Screening* der Fosmid-Bibliotheken nach ausgewählten Klonen

Die generierten Fosmidbibliotheken der genomischen DNA von Spheroidekörpern und *Cyanothece* sp. ATCC 51142 wurden mit zwei Methoden nach Klonen gescreent, welche bestimmte Sequenzen enthielten. Weiteres *Screening* diente der Identifizierung von Folgeklonen der Ausgangsfosmide.

2.2.9.1 *Screening* mittels Kolonie-PCR

Für das *Screening* der vereinzelteten Klone der Fosmid-Bibliotheken wurde die Kolonie-PCR verwendet. Hierzu wurden von 96-Loch-Mikrotiterplatten zunächst Reihenpools (bestehend aus jeweils 12 Klonen) in Freezing-Medium mit 12,5 µg/ml Chloramphenicol angeimpft und kultiviert. Die Reihenpool Kryokulturen wurden bei -80°C gelagert und dienten zur Herstellung von Plattenpools, welche alle 96 Klone einer Mikrotiterplatte enthielten.

Für die Identifizierung bestimmter Klone wurden ausgewählte Primer abgeleitet, welche in PCR-Reaktionen mit Klonen bzw. Poolfraktionen, welche das gesuchte Gen enthielten, spezifische Amplifikate lieferten.

Die in Kolonie-PCRs eingesetzten Primern waren SBnifD_uni, SBnifD_rev, CynifD_uni, CynifD_rev, F13A12/5_uni, F13A12/5_rev, F4D10/5_uni, F4D10/5_rev, F4D10/3_uni und F4D10/3_rev (Kap. 2.1.8).

Für die PCR-Reaktionen wurde je 1 µl Kultur von Platten- und Reihenpools oder Kulturen einzelner Klone in 60 µl sterilem ddH₂O resuspendiert und für 5 min bei 96°C inkubiert. Von diesem Ansatz wurde als Template 1µl in einer Standard-PCR von 25 µl eingesetzt.

Nach Identifizierung von Plattenpools, welche positive PCR-Amplifikate zeigten, wurden die Reihenfraktionen dieser Platte, danach die Einzelklone der positiven Reihe gescreent.

2.2.9.2 *Screening* mittels Kolonie-Blot

Um gesuchte, nicht in 96-Loch Mikrotiterplatten vereinzeltete, Klone aus den Fosmidbibliotheken zu identifizieren, wurden Koloniehybridisierungen durchgeführt.

Hierzu wurden Suspensionen der Stocks 1:10.000 in *Freezing*-Medium verdünnt und 100µl dieses Ansatzes auf großen (120 mm) Petrischalen mit LB + 12,5 µg/ml Chloramphenicol ausplattiert und für 16 h bei 37°C inkubiert.

Vor dem Auflegen der Membranen wurden die bewachsenen Platten (je ca. 1.000-2.000 Kolonien) für 2 h auf 4°C abgekühlt. Danach wurden Hybond N⁺-Rundfilter für 1 min auf die Platten gelegt und die Orientierung durch Einstechen mit einer sterilen Kanüle markiert.

Die Membranen wurden getrocknet und mit der Kolonieseite nach oben für 15 min auf Whatman-Filter gelegt, welche mit Denaturierungslösung getränkt waren. In diesem Schritt erfolgte die Lyse der Zellen und die Denaturierung der Fosmid-DNA. Danach wurden die Membranen je 15 min mit Neutralisierungslösung und 2xSSC behandelt und zur Immobilisierung der DNA für 1 h bei 80°C gebacken. Die Kolonie-Blots konnten dann bei RT gelagert und für Hybridisierungen mit spezifischen Sonden eingesetzt und positive Klone durch Hybridisierungssignale identifiziert werden.

Denaturierungslösung	:	0,5 M	NaOH
		1,5 M	NaCl
Neutralisierungslösung	:	1,0 M	Tris/HCl pH 8,0
		1,5 M	NaCl

2.2.10 Herstellung von Shotgun-Plasmid-Bibliotheken

Von ausgewählten Fosmid-Klonen wurden zur Sequenzierung Shotgun-Plasmid-Bibliotheken hergestellt. Hierzu wurde die isolierte Fosmid-DNA für die Ligation in Plasmide auf zwei Arten behandelt. Für die Ligation in linearisierte pUC19-Vektoren (MBI-Fermentas) wurde die Fosmid-DNA mit den Restriktionsendonucleasen *HindIII*, *EcoRI*, *XbaI*, *SpeI*, *KpnI* und *PstI* für 4 h bei 37°C restringiert und danach in geeignete pUC19-Vektoren ligiert. Restriktions- bzw. Ligationsansätze waren dabei wie folgt:

Restriktion	:	3 µl	Fosmid-DNA
		0,5 µl	Restriktionsenzym
		1 µl	10 x Restriktionspuffer
		5,5 µl	dd H ₂ O
Ligation	:	7,5 µl	Restringierte DNA
		0,5 µl	pUC19
		1 µl	10x Ligationspuffer
		1 µl	T4 Ligase

Um ein höhere Redundanz an verschiedenen Inserts sowie eine für die Sequenzanalyse optimale Insertgröße zu gewährleisten, wurde Fosmid-DNA für die Herstellung von Plasmid-Bibliotheken mittels des *pEZSeqTM Blue/White Cloning Kit* (Lucigen) physikalisch zu einer Fragmentgröße von 1000-1700 bp gesichert. Hierzu wurde Fosmid-DNA für 25 bis 35 sek im Ultraschallbad bei RT inkubiert. *Blunt-end* DNA wurde mit dem *DNA Terminator End Repair Kit* (Lucigen) hergestellt. Die Größenfraktionierung und Elution der DNA geeigneter Größe fand mittels Agarose-Gelelektrophorese und dem *JETsorb DNA extraction kit* (GENOMED) statt.

Eluierte DNA wurde nach Angaben des Herstellers in den Vektor pEZSeqTM ligiert.

6,5 µl	DNA
2,5 µl	4x pEZSeq TM Vector Premix
1 µl	CloneSmart TM DNA Ligase (2U/µl)
10 µl	gesamt

Ligationsansätze restringierter und physikalisch gescherter DNA wurden nach Angaben des Herstellers unter Verwendung des *TransformAID-Kit* (MBI Fermentas) in *E. coli* XL1 blue MRF' Zellen transformiert und auf geeigneten Selektionsmedien kultiviert.

2.2.11 Southern- und Dot-Blot

Die Analyse bestimmter Gene oder DNA-Fragmente fand modifiziert nach dem von Southern beschriebenen Protokoll statt (Southern, 1975)

Zur Analyse bestimmter Gene oder DNA-Regionen wurden DNA-Proben mit *HindIII* restringiert und die Ansätze über 1%ige Agarosegele aufgetrennt. Alternativ wurden auch spezifische PCR-Amplifikate unterschiedlicher Proben über Agarose-Gelelektrophorese separiert.

Für eine anschließende Hybridisierung wurden die Gele nach der Elektrophorese zunächst 1x für 10 min in SB1 (Depurinierung), danach je 2 x für je 15 min in SB2 (Denaturierung), SB3 (Neutralisierung) und 20xSSC inkubiert. Vor der Inkubation mit frischem Puffer wurden die Gele mit dH₂O gespült.

Für die Übertragung von DNA aus Agarosegelen auf Nylonmembranen wurde die Trockenblot-Methode verwendet. Hierzu wurde auf das vorbehandelte Gel eine mit 20xSSC

angefeuchtete Hybond-N+ Nylonmembran gelegt. Darauf folgten 3 mit 20xSSC befeuchtete 3MM Whatman-Filterpapiere sowie ein ca. 5 cm dicker Zellstoffstapel. Das Blot-Packet wurde in Frischhaltefolie eingeschlagen und mit einem Gewicht beschwert für 16-20 h bei 16°C inkubiert. In dieser Zeit erfolgte die Übertragung der DNA-Fragmente auf die Nylon-Membran. Nach dem Blotten wurde die Membran zur Immobilisierung der DNA für 40 min bei 80°C gebacken.

Eine weitere Methode bestand im direkten Dot-Blotten von genomischer DNA auf Nylonmembranen. Hierzu wurde genomische DNA für 5 min bei 96°C denaturiert, auf Eis gequencht und direkt auf 20xSSC getränkte Nylon-Membranen aufpipettiert. Die Membranen wurden anschließend für je 5 min mit der DNA-Seite nach oben auf Whatman-Filter gelegt, welche mit den Puffern SB1, SB2 und SB3 getränkt waren. Die Membranen wurden dann für 40 min bei 80°C gebacken.

SB1 (Depurinierung)	:	0,25 M	HCl
SB2 (Denaturierung)	:	1,5 M	NaCl
		0,5 M	NaOH
SB3 (Neutralisierung)	:	1,0 M	Tris/HCl pH 7,0
		3,0 M	NaCl

2.2.12 Synthese radioaktiver und nicht-radioaktiver DNA-Sonden

Die Synthese von [³²P] dCTP-markierten DNA-Sonden wurde mit dem *RediprimeTM II Random Prime Labelling System* (Amersham Pharmacia) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Als Template wurden gereinigte PCR-Produkte in einer Konzentration von 50 ng in 45 µl TE-Puffer eingesetzt. Nach der Synthese wurden freie Nukleotide mittels Chromatografie mit *NucTrap[®] Probe Purification Columns* (Stratagene) abgetrennt. Vor der Hybridisierung wurden die Sonden für 5 min bei 96°C denaturiert und für 5 min auf Eis gequencht.

Nicht-radioaktive Dig-markierte Sonden wurden mit dem *PCR DIG Probe Synthesis Kit* (Roche Diagnostics) nach Herstellerangaben generiert.

2.2.13 Hybridisierung von *Southern*-, *Dot*- und *Kolonie-Blot*membranen

Vor der Hybridisierung von Membranen mit radioaktiven und nicht-radioaktiven Digoxigenin-markierten Sonden erfolgte die Prähybridisierung zur Absättigung der Membranen für 2 h in Hybridisierungspuffer Roti-Hybri-QuickTM (Roth) bei Hybridisierungstemperatur. Danach erfolgte die Inkubation mit Sonde für 24 h. Für homologe Hybridisierungen wurde bei 63°C, bei nicht-homologen Hybridisierungen bei 50°C inkubiert. Nach der Hybridisierung wurde die Sonde entfernt und die Membran für je 15 min mit Waschlösung I (5x SSC, 0,5% (w/v) SDS), Waschlösung II (1x SSC, 0,5% (w/v) SDS) und Waschlösung III (0,5x SSC, 0,5% (w/v) SDS) bei Hybridisierungstemperatur gewaschen. Bei Hybridisierung mit radioaktiv markierten Sonden wurde die Membran in Frischhaltefolie eingeschlagen und ein Röntgenfilm bei -70°C exponiert.

Digoxigenin-markierte Sonden wurden durch die entstehende Lumineszenz von Alkalische Phosphatase-konjugierten *anti*-Digoxigenin F(ab)₂-Fragmenten mit den Chemilumineszenzsubstrat CDP-Star nach dem von Boehringer (Mannheim) beschriebenen Protokoll auf Röntgenfilmen detektiert.

2.2.14 *In-situ* Lokalisationsstudien an *Rhopalodia gibba*

Die Behandlung der Proben fand modifiziert nach der LRgold-Einbettungsmethode von McFadden statt (McFadden, 1991).

Rhopalodia-Zellen wurden mit 1 % Glutaraldehyd in Kulturmedium fixiert und anschließend durch Behandlung mit Ethanol in aufsteigenden Konzentrationen (30%, 50%, 70%, 80%, 90%, absol. EtOH) entwässert. Danach wurden die Zellen bei RT für 12-16 h in LRgold (Agar Scientific, Cambridge) und abs. Ethanol im Verhältnis 1:1 imprägniert, und für 4 h bei RT in LRgold unverdünnt eingebettet. Zur Polymerisation wurden die Proben belichtet. An einem Ultracut-Mikrotom (Reichert-Jung, Wien) wurden Präparate in einer Dicke von 90 Å geschnitten und die Dünnschnitte auf Goldnetze gefischt. Die Präparate wurden mit Erstantikörper (*anti*-FeMo-*rabbit*-IgG) in einer Verdünnung von 1: 600 (Tagfixierung) bzw. 1:800 (Nachtfixierung) für 1-2 h inkubiert und gewaschen. Danach erfolgte die Inkubation mit Zweitantikörper (*anti*-*rabbit*-IgG) 1:140 für 1 h.

Zur Nachkontrastierung wurden die Präparate für 5 min mit gesättigter Uranylacetatlösung und anschließend 5 min Bleicitratlösung inkubiert. Nach vollständigem Trocknen wurden die Präparate mit einem Transmissionselektronenmikroskop EM301 (Phillips, Aachen) analysiert.

2.2.15 *In-situ* Hybridisierungen an *Rhopalodia gibba*

Rhopalodia gibba Zellen wurden geerntet, in 4% Glutaraldehyd fixiert, entwässert und in LRgold eingebettet. Geschnittene Präparate wurden in Hybridisierungspuffer nach McFadden (McFadden, 1991) 2 bis 3 h prähybridisiert und danach über Nacht mit der biotinylierten Oligonukleotid-Sonde 16S-SK-biot hybridisiert. Nach Waschen der Präparate in 4xSSC, 2xSSC und 1xSSC wurden die Schnitte mit *anti*-Biotin IgG und sekundärem *anti*-mouse IgG Cy2 inkubiert und die Fluoreszenz mit einem Konfokalen Laser Scanning Mikroskop (Leica) analysiert.

2.2.16 UV/Vis Spektroskopie

Isolierte Sphaeroidkörper sowie *Cyanothece* sp. ATCC 51142 Zellen wurden auf gleiche Zellzahl bzw. gleiche Ausgangs-Absorption bei 280 nm eingestellt und in einem Volumen von 100 µl 1x HMS ausgenommen. Die Absorptionsmessung fand in Quarzküvetten mit dem Spektralphotometer Ultrospec II (Pharmacia) gegen 1xHMS als Referenz statt. Nach jeder Messung wurde die Probe neu durchmischt, um ein Absinken der Zellen zu verhindern.

2.2.17 Acetylen-Reduktionsassay

Die Nitrogenase-Aktivität von *Rhopalodia gibba* wurde mit dem Acetylen-Reduktionassay (Steward et al., 1967) bestimmt.

Rhoplaodia-Zellen wurden vor der Messung in gasdichten 450 ml Fernbachkolben mit 100 ml Kulturmedium ohne Stickstoffquelle ($\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$) bei 20 °C für 4 bis 5 Tage vorkultiviert. Der Reduktions-Assay wurde mit Kulturen durchgeführt, welche sich während der Messungen in einem Hell/Dunkel Zyklus von 16/8 h befanden, und mit Kulturen, welche im Dauerdunkel gehalten wurden. Nach Zugabe von 10% Acetylen (35 ml) in die Gasphase der Kulturkolben wurde die Bildung von Ethylen für die Dauer von 72 h gaschromatographisch verfolgt. Hierzu wurden im Abstand von 2-4 h je 5 ml Gasproben entnommen. Zur Messung der Acetylen- und Ethylen-Konzentrationen wurde ein Varian

Modell 2280 Gaschromatograph mit Chromopak Säule und FID (*flame ionization detector*) verwendet. Als Kontrollen wurden Kulturen ohne Acetylen-Zugabe und reines Medium mit Acetylen vermessen.

2.2.18 Herstellung von Gesamtproteinextrakt aus *Rhopalodia gibba*

100 ml Algenkultur wurde für 5 min bei 1000 x g zentrifugiert, das Pellet in 400 µl Proteinextraktionspuffer aufgenommen und 15 min bei 95°C gekocht. Danach wurden unlösliche Bestandteile 10 min bei 14.000 rpm abzentrifugiert.

Proteinextraktionspuffer:	3 % (w/v)	SDS
	0,2 % (w/v)	Triton X-100
	125 mM	Tris/HCl pH 6.8

2.2.19 Proteinbestimmung nach Bradford

Die Proteinbestimmung wurde nach dem in Asubel et al. (1996) angegebenen Protokoll nach Bradford durchgeführt (Bradford, 1976).

Hierzu wurden 2 bis 10 µl der Proteinproben in 100 µl 0,15 M NaCl aufgenommen und mit 1 ml Färbelösung versetzt. Der Ansatz wurde gevortext, 2 min bei RT inkubiert und dann die Absorption bei 595 nm bestimmt.

Als Standard diente eine 0,5 mg/ml BSA-Lösung. Von dieser Lösung wurden in doppelten Ansätzen 5, 10, 15 und 20 µl mit 0,15 M NaCl auf 100 µl aufgefüllt, mit Färbelösung versetzt und die Absorption bei 595 nm bestimmt.

Färbelösung (pro Liter):	100 mg	Coomassie Blue G-250
	50 ml	95% Ethanol
	100 ml	85% Phosphorsäure

2.2.20 Phylogenetische Analysen

Phylogenetische Analysen anhand 16S rDNA-Sequenzen und NifD-Aminosäuresequenzen wurden von P. Lockhart (Massey University, Pamerston North, Neuseeland) wie in der Literatur beschrieben berechnet (Prechtel et al., 2004).

3 Ergebnisse

3.1 Morphologische Untersuchungen an *Rhopalodia gibba*

Rhopalodia gibba wurde aus Tümpeln des Botanischen Gartens, Marburg, isoliert und in mehreren Kultivierungsschritten aufgereinigt. Die Zellen konnten nicht axenisch kultiviert werden, sondern zeigten immer leichte bakterielle Kontaminationen. *R. gibba* konnte zudem in gefluteten Reisfeldern, welche Teil der Forschung anderer Gruppen des SFB 395 sind, nachgewiesen werden.

Die Diatomeen zeigten in Kultur bei einer Generationszeit von ca. 4 Tagen ein adhärentes Wachstum am Boden der Kulturgefäße und die Ausbildung einer extrazellulären Matrix, welche unterschiedlich stark ausgebildet sein konnte.

Die Kultivierung von *R. gibba* in Medium mit und ohne Stickstoffquelle in Form von $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ zeigte keinen Unterschied in Wachstumsrate oder Morphologie der Zellen.

In mikroskopischen Betrachtungen wurden die Diatomeen-Zellen näher untersucht. Abbildung 3-1 zeigt eine fluoreszenzmikroskopische Aufnahme einer *R. gibba* Zelle kurz vor der Zellteilung.

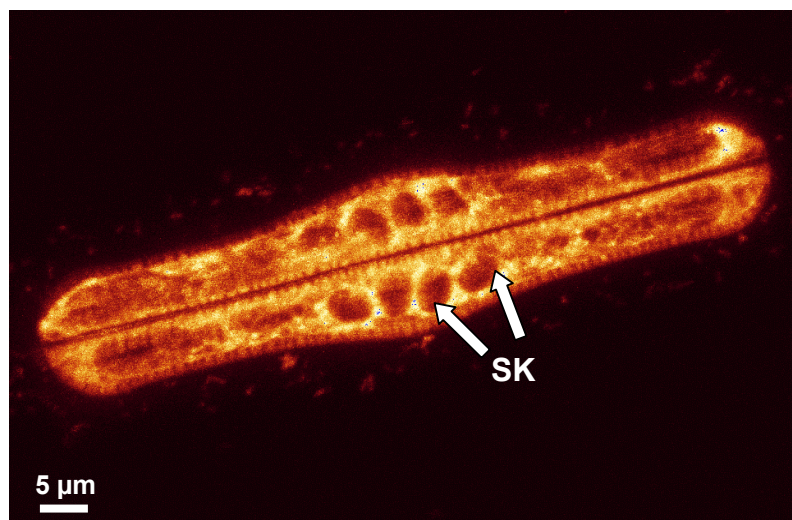


Abb. 3-1: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme von *Rhopalodia gibba*. SK: Sphaeroidkörper

Unter den verwendeten Laborbedingungen zeigten sich immer vier Sphaeroidkörper pro Zelle, welche vor der Teilung der Wirtszelle verdoppelt und auf die entstehenden Tochterzellen verteilt werden (siehe Abb. 3-1). In fluoreszenzmikroskopischen Betrachtungen war eine starke Autofluoreszenz der Diatomeen zu beobachten, welche bei Anregung durch blaues Licht am stärksten war, und auf die chromophoren Gruppen des Chloroplasten zurückzuführen ist. Die Sphaeroidkörper zeigten bei Anregung mit verschiedenen Wellenlängen keine derartige, auf Photosynthesepigmente beruhende, Autofluoreszenz.

Größe und Morphologie der Sphaeroidkörper entsprachen den in der Literatur angegebenen Werten (Drum und Pankratz, 1965). In elektronenmikroskopischen Aufnahmen konnten die internen Thylakoid-artigen Membranen, die doppelte Hüllemembran sowie die äußerste Membran der Sphaeroidkörper dargestellt werden (Abb. 3-2). Diese Membranen wurden aufgrund des vermuteten endosymbiontischen Charakters der Sphaeroidkörper als Symbiontophore Membran (SBM, entspricht äußerster Membran) sowie Sphaeroidkörper-Membran 1 und 2 (SKM1 bzw. 2 = inneres Membranpaar) bezeichnet (Prechtel et al., 2004).

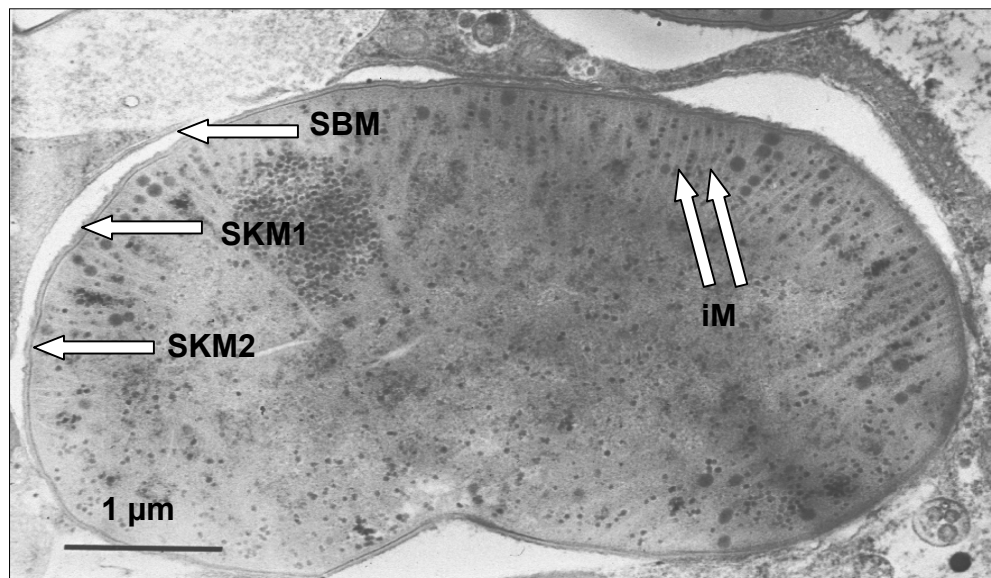


Abb. 3-2: Elektronenmikroskopische Aufnahme eines Sphaeroid-körpers innerhalb *Rhopalodia gibba*. SBM: Symbiontophore Membran, SKM1: Sphaeroidkörper Membran 1, SKM2: Sphaeroid-körper Membran 2, iM: interne Membranen

3.2 Messung der Nitrogenase-Aktivität von *Rhopalodia gibba*

Floener und Bothe entdeckten während ihrer Untersuchungen an Diatomeen die Fähigkeit von *Rhopalodia gibba*, molekularen Stickstoff zu fixieren (Floener und Bothe, 1980).

Da es sich bei den experimentell verwendeten Diatomeen um ein neues Isolat aus dem botanischen Garten handelte, wurden die kultivierten Zellen auf ihre Fähigkeit zur Stickstofffixierung überprüft. Um eine eventuell temporäre Nitrogenase-Aktivität nachzuweisen, wurden für die Tests Kulturen verwendet, welche sich in einem Hell-Dunkel-Rhythmus befanden, sowie Zellen, welche für die Zeit der Messung im Dauerdunkel gehalten wurden.

Die Kultivierung der Zellen für die Nitrogenase-Messung fand in Medium ohne Stickstoffquelle statt. Hierzu wurden je 100 ml Medium mit $2,6 \times 10^6$ Zellen angeimpft und für 4 Tage vorkultiviert. Anschließend wurde die Nitrogenase-Aktivität der Hell-Dunkel- und Dauerdunkel-Kulturen über einen Zeitraum von 72 h verfolgt, wobei die Hell-Dunkel-Kulturen nur in der Lichtphase vermessen wurden. Je Messreihe wurden 3 unabhängige Kulturen von Hell-Dunkel- und Dauerdunkel-Inkubation vermessen.

Die Messung der Nitrogenase-Aktivität erfolgte über den Acetylen-Reduktions-Test, in welchem die Nitrogenase-abhängige Reduktion von Acetylen zu Ethylen gaschromatographisch bestimmt wurde (Kap. 2.2.17). Als Negativkontrollen dienten bewachsene Kulturen ohne Acetylenzugabe, um interne Ethylenproduktion durch die Diatomeen auszuschließen, sowie reines Kulturenmedium mit Acetylenzugabe, um eine eventuelle spontane Reduktion des Acetylens zu messen.

Nach erfolgter Messung wurden die einzelnen Kulturen geerntet und Gesamtproteinextrakte hergestellt. Die Proteinmenge der Kulturen wurde mittels der Proteinbestimmung nach Bradford ermittelt (Kap. 2.2.19).

Abb. 3-3 zeigt das Ergebnis des Nitrogenase-Assays. Aufgetragen ist die Menge an gebildetem Ethylen in nmol pro mg Gesamtprotein gegen die Zeit. Die Graphen für Hell-Dunkel- sowie für Dauerdunkel-Kulturen entstanden durch Berechnung der Mittelwerte aus allen Messungen sowie Proteinbestimmungen.

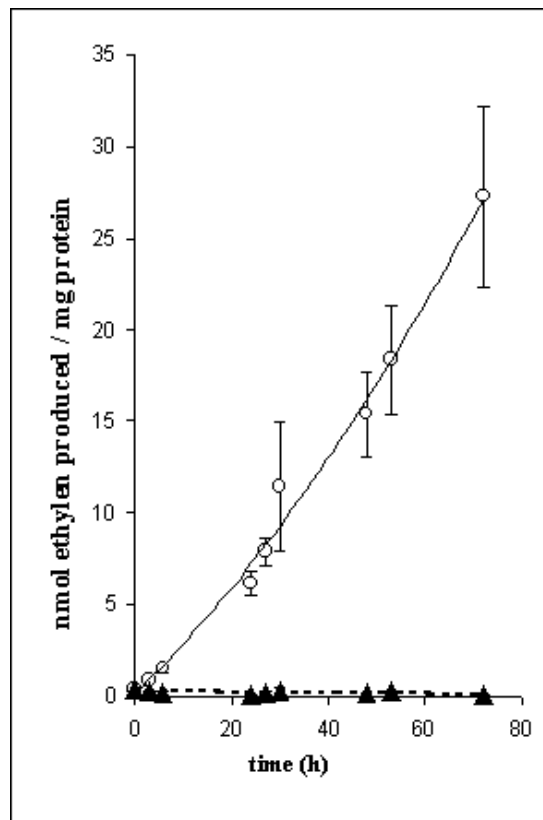


Abb. 3-3: Messung der Stickstofffixierung von *Rhopalodia gibba* Kulturen mit dem Acetylenreduktionsassay. Die Ethylenproduktion (nmol) pro mg Protein ist gegen die Zeit (h) aufgetragen. (O) Ethylenproduktion von Hell-Dunkel-Kulturen, (▲) Ethylenproduktion von Dauerdunkel-Kulturen (aus Prectl et al., 2004)

In den Acetylen-Reduktionsassays konnte die in der Literatur beschriebene Nitrogenase-Aktivität von *R. gibba* bestätigt werden.

Es zeigte sich eine Reduktion von Acetylen zu Ethylen in Licht-abhängiger Weise. Nur Kulturen, welche sich zur Zeit der Messung in der Hell-Phase befanden, zeigten Nitrogenase-Aktivität. Diese betrug 0,367 nmol Ethylen pro Stunde und $2,5 \times 10^6$ Zellen.

Bei Kulturen in der Dunkelphase bzw. im Dauerdunkel konnte keine Nitrogenase-Aktivität festgestellt werden. Um zu überprüfen, ob die Kulturen, welche im Dunkeln kultiviert wurden, zur Reduktion von Acetylen fähig sind, wurden diese nach Abschluss der Messreihen im Hellen inkubiert und die Messung für diese Kulturen fortgesetzt (nicht gezeigt). Nach einer Verzögerungsphase von ca. 2 h konnte bei diesen Kulturen Nitrogenase-Aktivität über Ethylenproduktion nachgewiesen werden.

Bei *R. gibba* Kulturen ohne Acetylenzugabe konnte keine interne Ethylenproduktion festgestellt werden. In reinem Medium fand keine spontane Reduktion von zugegebenem Acetylen statt.

3.3 Isolation intakter Sphaeroidkörper aus *Rhopalodia gibba*

Um molekularbiologische Untersuchungen an Sphaeroidkörpern durchführen zu können, mussten diese zunächst intakt aus *R. gibba* isoliert und aufgereinigt werden. Hierzu wurde die in Kap. 2.2.3 ausführlich beschriebene Methode benutzt (siehe auch Kneip, 2002).

R. gibba-Kulturen wurden zentrifugiert und die Pellets mehrmals gewaschen. Danach wurden die Diatomeen mit einem Homogenisator aufgebrochen. Um Kontaminationen durch nukleäre DNA zu verhindern, wurde während der Homogenisation DNase I zugegeben. Nach dem Zellaufschluss wurden zunächst intakte Zellen und große Zelltrümmer pelletiert. Durch Zentrifugation des cytoplasmatischen Überstands erhielt man eine Fraktion, welche Sphaeroidkörper sowie weitere zelluläre Bestandteile enthielt. Die Aufreinigung der Sphaeroidkörper wurde anschließend über Dichtegradientenzentrifugation mittels eines vierstufigen Percollgradienten (20%, 50%, 60%, 70%) durchgeführt. Abb. 3-4 zeigt einen Percollgradienten nach der Zentrifugation.

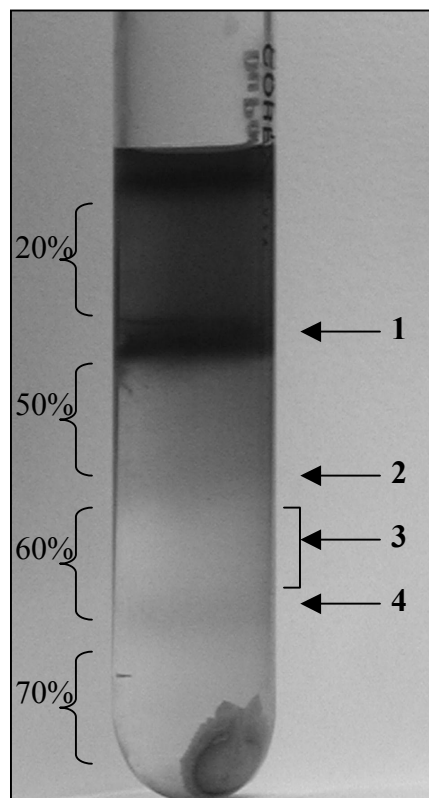


Abb. 3-4: Percollgradient zur Isolation intakter Sphaeroidkörper. Fraktionen verschiedener Zusammensetzung sind nummeriert und im Text näher erläutert (aus Kneip, 2002).

Die Zentrifugation über einen diskontinuierlichen Percollgradienten ergab verschiedene Banden bzw. Fraktionen, welche sich in ihrer Zusammensetzung unterschieden. Fraktion 1 enthielt vor allem Plastiden und Bakterien, welche mit *R. gibba* in Kultur vorkommen und in vorherigen Aufreinigungsschritten nicht eliminiert werden konnten. Fraktion 2 enthielt Sphaeroidkörper sowie Plastiden und zahlreiche Zelltrümmer. Die Fraktionen 3 und 4 waren reich an Sphaeroidkörpern, wobei Fraktion 4 die wenigsten Kontaminationen aufwies. Diese Fraktionen wurden für weitere Aufreinigungsschritte verwendet. Hierzu wurden die Fraktionen in mehreren Waschschritten über Percollkissen (60%) gereinigt.

Die verschiedenen Fraktionen wurden fortwährend mikroskopisch auf eventuelle Kontaminationen kontrolliert. Abb. 3-5 zeigt eine lichtmikroskopische Aufnahme isolierter, intakter Sphaeroidkörper.



Abb. 3-5: Mikroskopische Aufnahme isolierter Sphaeroidkörper (SK) (aus Pechtl et al., 2004).

Isolierte Sphaeroidkörper der gereinigten Gradienten-Fraktionen 3 und 4 waren frei von zellulären Kontaminationen. Die in Abb. 3-5 vorhandenen Trümmer stellen Reste der Kieselsäureschale der Diatomee dar und waren für spätere Experimente nicht von Bedeutung. Lichtmikroskopisch konnte bei isolierten Sphaeroidkörpern keine photosynthetische Pigmentierung festgestellt werden, bei fluoreszenzmikroskopischer Anregung zeigte sich keine Autofluoreszenz.

Um zu überprüfen, ob Sphaeroidkörper auch ohne ihre Wirtszellen zu kultivieren sind, wurden verschiedene Kulturmedien mit isolierten Sphaeroidkörpern angeimpft und inkubiert. Es konnte kein Wachstum der Sphaeroidkörper festgestellt werden. Isolierte Sphaeroidkörper

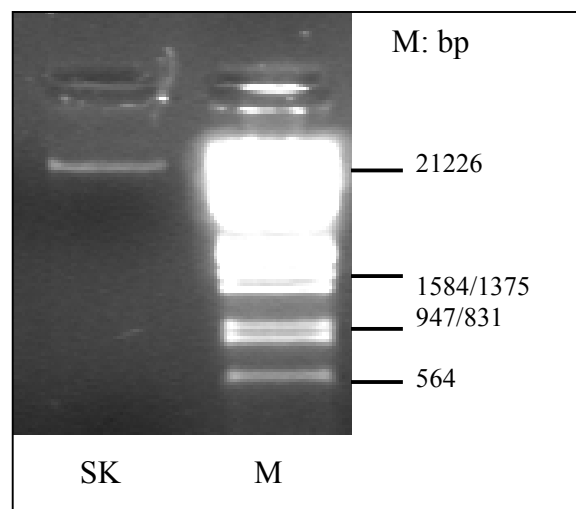
in Kultur zeigten morphologisch keine Unterschiede zu solchen innerhalb der Diatomeen (persönliche Mitteilung Dr. K. Wenderoth).

3.4 Isolierung genomischer DNA aus Sphaeroidkörpern

Zum experimentellen Nachweis der endosymbiontischen Natur der Sphaeroidkörper sollten Fraktionen isolierter und intakter Sphaeroidkörper zur Präparation von DNA verwendet werden. Sphaeroidkörper-spezifische DNA würde dabei die organismische Herkunft und damit den endosymbiontischen Charakter der Interaktion bestätigen.

Zur Präparation genomischer DNA von Sphaeroidkörpern wurde die Methode der DNA-Isolation aus *Cyanothece*-Zellen angewendet (Kap. 2.2.2.3). Als Ausgangsmenge dienten isolierte Sphaeroidkörper aus 10 Litern *R. gibba*-Kultur.

Abb. 3-6 zeigt ein 1% Agarosegel zur Analyse der DNA-Isolation aus isolierten Sphaeroidkörpern.



**Abb. 3-6: Analyse von Sphaeroidkörper
DNA in 1%igem Agarosegel (aus Kneip, 2002)**

Die Präparation von DNA aus isolierten Sphaeroidkörpern ergab hochmolekulare, gescherte DNA. Diese Sphaeroidkörper DNA-Fraktion wurde für weitere molekularbiologische Analysen verwendet.

3.5 Amplifikation und Analyse der Sphaeroidkörper-16S rDNA

Die von isolierten Sphaeroidkörper-Fraktionen präparierte DNA wurde als Template für PCR-Amplifikationen mit 16S rDNA-Oligonukleotiden eingesetzt, welche spezifisch für die 16S rDNA Sequenzen verschiedener Eubakterien und Plastiden waren (Kap. 2.1.8).

Mittels PCR konnte aus Sphaeroidkörper-DNA ein spezifisches Fragment amplifiziert werden. Das PCR-Produkt hatte eine Größe von 1479 bp und zeigte bei BlastN-Analysen die größte Ähnlichkeit mit cyanobakteriellen 16S rDNA Sequenzen.

Das amplifizierte 16S rDNA-Fragment wurde für weitere molekularbiologische Analysen eingesetzt. Dazu gehörten zum einen experimentelle Ansätze, welche die Herkunft der isolierten DNA-Fraktion innerhalb der Wirtszelle bestätigen sollten. Hierzu wurden sowohl *Southern*-, als auch *In-situ* Hybridisierungen durchgeführt. Des Weiteren wurde die 16S rDNA-Sequenz zu Stammbaumanalysen eingesetzt, um nähere Informationen über den phylogenetischen Ursprung der Sphaeroidkörper zu erhalten.

3.5.1 *Southern*-Hybridisierung von Sphaeroidkörper gDNA

Southern-Hybridisierungen gegen verschiedene DNA-Fraktionen dienten als Kontrolle, ob es sich bei dem amplifizierten 16S rDNA-Fragment um eine Sequenz der Sphaeroidkörper DNA bzw. des Sphaeroidkörper-Genoms handelt.

Hierzu wurden im Verlauf der Sphaeroidkörper-Isolation verschiedene Fraktionen entnommen, und von den Zell- bzw. Kulturproben jeweils DNA isoliert. Die verschiedenen Fraktionen sowie bakterielle Kontroll-DNAs dienten jeweils als Template für PCR-Reaktionen mit 16SrDNA-spezifischen Oligonukleotiden aus Kap. 3.4. Die Amplifikate wurden über Gelelektrophorese aufgetrennt, geblottet und hybridisiert. Als Sonde wurde ein 21 Nukleotide langes Digoxigenin-markiertes Oligonukleotid verwendet. Die Sequenz dieser Primer-Sonde wurde mittels ClustalX Alignments des aus Sphaeroidkörper-DNA amplifizierten Fragments mit zahlreichen anderen cyanobakteriellen sowie plastidären 16S-rDNA Sequenzen ermittelt und war spezifisch für das Sphaeroidkörper-16S rDNA Fragment (Kap. 2.1.8). Die Hybridisierung wurde für 16 h bei 64°C durchgeführt, die Blots wurden je 15 min mit steigender Stringenz bei Hybridisierungstemperatur gewaschen, um unspezifische Bindungen auszuschliessen. Abb. 3-7 zeigt das Ergebnis der *Southern*-Blot Analyse.

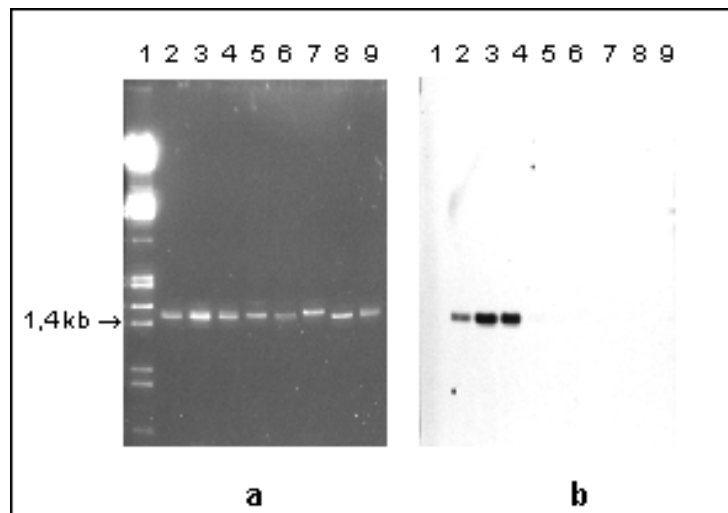


Abb. 3-7: Southern-Analyse der 16S-PCR-Amplifikate verschiedener DNA-Fractionen.

A: 1%iges Agarose-Gel der PCR-Amplifikate, b: Southern-Hybridisierung mit Dig-markierter Oligonukleotidsonde; 1: λ EcoRI/HindIII DNA Marker, Spuren 2-9: 16S-Amplifikate aus: 2: *R. gibba* gesamt DNA, 3+4: Sphaeroidkörper-DNA, 5: Kultur-Überstand ohne *R. gibba*, 6: Überstand mit extrazellulärer Matrix, 7: *E. coli* DNA, 8: *Bradyrhizobium japonicum* DNA, 9: *Synechocystis* sp. DNA

Die PCR mit 16S-rDNA Oligonukleotiden und verschiedenen DNA-Präparationen als Template lieferte in allen Ansätzen ein spezifisches Amplifikat (Abb. 3-7 a). Die PCR-Produkte der Fraktionen 5 und 6 sind auf Bakterien zurückzuführen, welche in den verwendeten *R. gibba* Kulturen vorkommen und vor allem in der extrazellulären Matrix der Diatomeen zu finden sind.

Die Southern-Hybridisierung mit der Oligonukleotid-Sonde, welche spezifisch für das aus der Sphaeroidkörper-Fraktion amplifizierte 16S rDNA-Fragment war, zeigte nur in den Proben 1 bis 3 ein spezifisches Hybridisierungssignal. Bei diesen Proben wurde als Template für die vorhergehende PCR *R. gibba* gesamt DNA sowie DNA isolierter Sphaeroidkörper aus zwei unabhängigen Präparationen verwendet. Amplifikate aus DNA-Isolationen von Fraktionen des Kulturüberstands sowie cyanobakterielle (Abb.3-7, Spur 9) und nicht-cyanobakterielle (Abb.3-7, Spur 7 und 8) 16S-rDNA-Fragmente lieferten kein Signal.

3.5.2 *In-situ* Hybridisierung von Sphaeroidkörper 16S rDNA

Die PCR-Analyse der aus isolierten Sphaeroidkörpern gewonnenen DNA-Fraktion lieferte ein spezifisches 16S rDNA Fragment von 1479 bp Größe (Kap. 3.5). Die Herkunft dieses Fragments bzw. der zugrundeliegenden Template-DNA wurde über Datenbank-Analysen und *Southern*-Hybridisierungen näher untersucht. Für eine direkte Markierung der aus gereinigten Sphaeroidkörper-Fractionen isolierten DNA innerhalb der Diatomeenzelle wurden zusätzlich *in-situ* Hybridisierungen durchgeführt.

Als Sonde für die Hybridisierung diente dabei das Fragment-spezifische Oligonukleotid, welches bereits in den *Southern*-Experimenten verwendet wurde. Eine 5'-Biotinylierung des Oligonukleotids ermöglichte die spätere Detektion über einen *mouse anti*-Biotin IgG Erstantikörper sowie einen *anti-mouse* IgG Cy2-fluoreszenzmarkierten Zweitantikörper.

Die verwendete Sonde sollte innerhalb der Diatomeenzelle die subzelluläre Lokalisation der DNA ermöglichen, welche aus den Sphaeroidkörper-haligen Fraktionen isoliert werden konnte.

Für die Hybridisierung wurden Diatomeenzellen wie in Kap 2.2.15 beschrieben eingebettet, geschnitten und mit der Sonde hybridisiert (McFadden, 1991). Als Kontrolle wurden die Schnitte mit Antikörpern ohne vorherige Hybridisierung mit der spezifischen 16S-rDNA Sonde inkubiert. Abbildung 3-8 zeigt das Ergebnis der *in-situ* Hybridisierung an *R. gibba* Zellen.

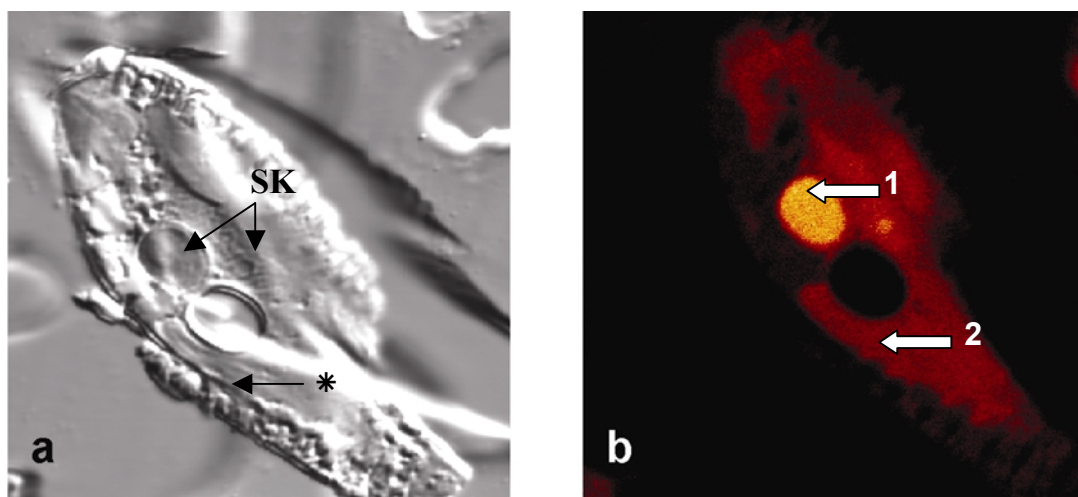


Abb. 3-8: *In-situ* Hybridisierung der aus Sphaeroidkörper-Isolationen gewonnenen 16S rDNA an ganzen *R. gibba* Zellen. a: Phasenkontrastmikroskopische Aufnahme von Sphaeroidkörpern (SK) innerhalb der Diatomeenzelle, *: Abdruck eines herausgebrochenen Sphaeroidkörpers b: *In-situ* Hybridisierung von (a) mit 16S rDNA-Oligonukleotid-Sonde, 1: Sphaeroidkörper mit Hybridisierung, 2: Sphaeroidkörper-„Abdruck“ ohne Hybridisierung (nach Prectl. et al., 2004)

Die Hybridisierung mit der Biotin-markierten Oligonukleotid-Sonde ergab in *R. gibba* Zellen nur ein Signal innerhalb der Sphaeroidkörper. Abbildung 3-8 b zeigt deutlich die Cy2-abhängige Fluoreszenz innerhalb eines Körpers sowie das kleinere Fluoreszenzsignal eines während der Präparation angeschnittenen Sphaeroidkörpers. Ein Sphaeroidkörper der dargestellten Diatomeen-Zelle ging im Verlauf der Präparation verloren, der „Abdruck“ dieses Körpers zeigt kein Signal. Das schwache Signal der gesamten Zelle bei Fluoreszenzanregung ist auf die Autofluoreszenz der Plastidenpigmente zurückzuführen.

3.5.3 Phylogenetische Analyse der Sphaeroidkörper 16S rDNA-Sequenz

Molekularbiologische Analysen der DNA-Fraktion, welche aus intakten und aufgereinigten Sphaeroidkörpern isoliert wurde, bestätigten, dass die Sphaeroidkörper DNA enthalten (Kap. 3.5.2 und 3.5.3). BlastN-Analysen des amplifizierten und sequenzierten 16S rDNA-Fragments zeigten dabei die größte Ähnlichkeit mit cyanobakteriellen 16S-Sequenzen.

Um die phylogenetische Herkunft der Sphaeroidkörper näher zu bestimmen, wurde die Nukleotidsequenz der 16S rDNA für die Berechnung phylogenetischer Bäume verwendet (Ludwig und Schleifer, 1994). Hierfür wurde zunächst für eine Primäranalyse ein Alignment der Sphaeroidkörpersequenz mit den 16S Sequenzen von 175 Taxa, darunter 8 Gruppen nicht-photosynthetischer Eubakterien, 9 unterschiedlichen Plastiden und 158 verschiedenen Cyanobakterien durchgeführt (Pechtl et al., 2004). Abb. 3-9 zeigt einen Baum, welcher aus den Daten mittels der *neighbour joining* Methode (Saitou und Nei, 1987) berechnet wurde.

Die phylogenetische Analyse ergab deutliche interne Knotenpunkte für die Gruppe nicht-photosynthetischer Bakterien, für die verschiedenen Plastidensequenzen sowie für die cyanobakteriellen 16S rDNAs. Die einzelnen phylogenetischen Gruppen konnten gut gegeneinander abgegrenzt werden. Die Sphaeroidkörper 16S Sequenz liegt dabei innerhalb der cyanobakteriellen Gruppe.

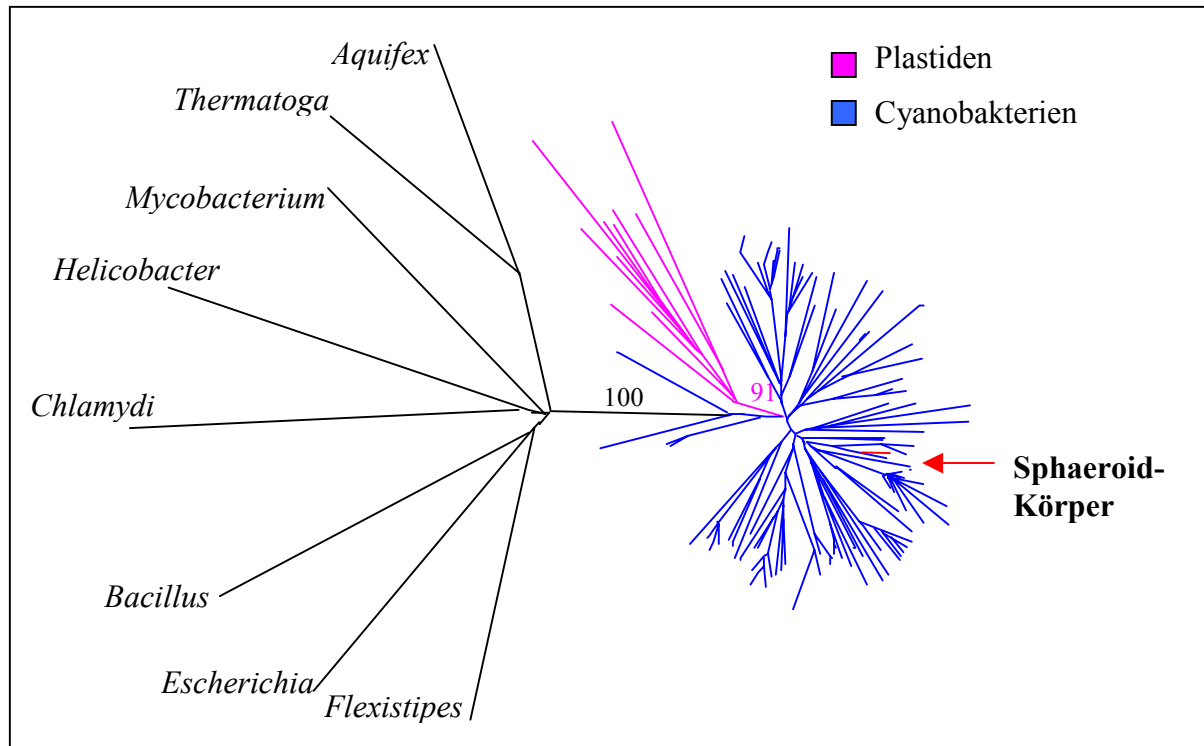


Abb. 3-9: *Neighbour joining* Primäranalyse der Sphaeroidkörper 16S rDNA Sequenz mit eubakteriellen, plastidären und cyanobakteriellen Sequenzen.

Die phylogenetische Primäranalyse zeigt, dass die Sphaeroidkörper-Sequenz innerhalb der cyanobakteriellen Gruppe liegt. Dabei sind die Sphaeroidkörper deutlich von den verschiedenen Plastidensequenzen separiert. Um genauere Aussagen über die Verwandtschaftsbeziehungen der Sphaeroidkörper innerhalb der Cyanobakterien treffen zu können, wurden *Minimum-evolution* Bäume der 16S rDNA berechnet (Kidd & Sgaramella-Zonta, 1971). Dabei wurden 28 cyanobakterielle und 9 plastidäre Sequenzen sowie die Sphaeroidkörpersequenz verwendet.

Abb. 3-10 zeigt einen skalierten Baum der sekundären Verwandtschaftsanalyse innerhalb der cyanobakteriellen bzw. plastidären Gruppe.

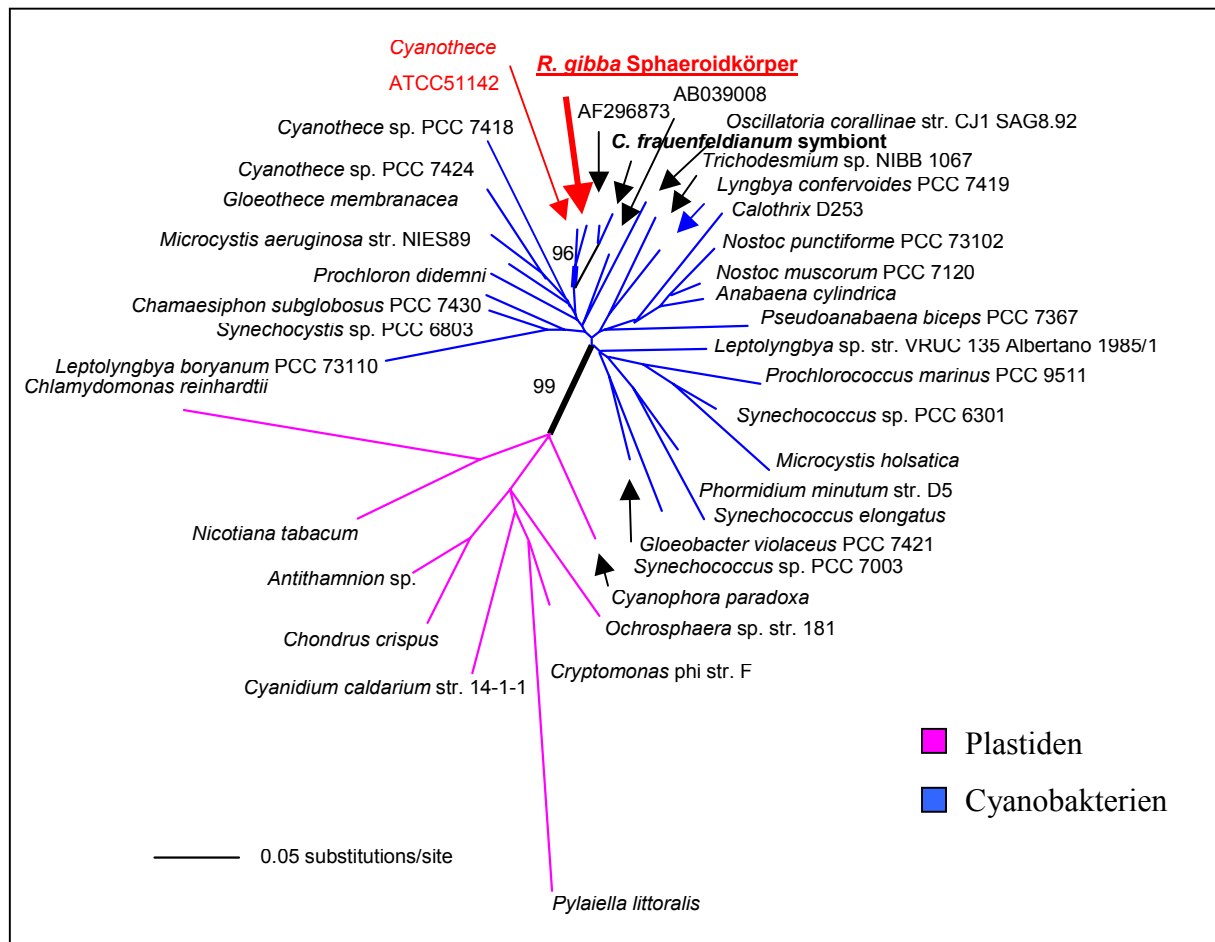


Abb. 3-10: Minimum-evolution Analyse verschiedener 16S rDNA Sequenzen. Astlängen und *bootstrap*-Raten für relevante interne Äste sind angegeben (nach Prechtel et al., 2004).

Die sekundäre Stammbaumanalyse bestätigte die Verwandtschaft der Sphaeroidkörper mit Cyanobakterien. Hierbei zeigt sich die größte Ähnlichkeit der Sphaeroidkörper 16S rDNA-Sequenz mit den Sequenzen von freilebenden Cyanobakterien der Gruppe *Cyanosyce* sp.. Als nächster freilebender Verwandter der Sphaeroidkörper konnte der Stamm *Cyanosyce* sp. ATCC 51142 bestimmt werden. Eine große Ähnlichkeit zeigt sich aber auch mit der Sequenz des intrazellulären cyanobakteriellen Symbionten der Diatomee *Climacodium frauenfeldianum*. In der Analyse konnte eine mögliche plastidäre Natur der Sphaeroidkörper nicht festgestellt werden.

3.6 Amplifikation von *nifD* aus Sphaeroidkörper-DNA

Die Acetylen-Reduktionsassays bestätigten, dass *Rholaplodia gibba* Zellen in der Lage sind, molekularen Stickstoff in einer Licht-abhängigen Reaktion zu fixieren. In welchen zellulären Kompartimenten der Diatomee die Fixierungsreaktion stattfindet, konnte jedoch bisher nicht eindeutig bestimmt werden.

In phylogenetischen Analysen konnte eine enge Verwandtschaft der Sphaeroidkörper mit freilebenden Cyanobakterien der Gruppe *Cyanothece* sp. nachgewiesen werden. *Cyanothece* gehört zur Gruppe der unizellulären, diazotrophen Cyanobakterien. In diesen Bakterien findet sowohl Photosynthese als auch molekulare Stickstofffixierung statt. Aufgrund der Verwandtschaft der Sphaeroidkörper zu diesen diazotrophen Cyanobakterien wurden die Körper molekularbiologisch und histologisch auf Komponenten der Stickstofffixierung untersucht.

Das Enzym, welches die Reduktion von molekularem Distickstoff zu NH_3 katalysiert, ist in allen bekannten Systemen der Nitrogenase-Komplex (Kap. 1.5). Gene, welche an der Stickstofffixierung direkt oder indirekt beteiligt sind, und welche nur unter Fixierungsbedingungen exprimiert werden, werden als *nif* (*nitrogen fixation*)-Gene bezeichnet.

Dazu gehören auch die Gene, welche für die Strukturkomponenten des Nitrogenase-Enzym-Komplexes kodieren. Dies sind das Gen *nifH* für die Nitrogenase-Reduktase sowie die Strukturgene *nifD* und *nifK* für die Untereinheiten der Nitrogenase.

Um die Sphaeroidkörper auf ein Vorkommen der Nitrogenase zu untersuchen, wurden PCR-Reaktionen mit Oligonukleotiden verwendet, welche gegen das Gen *nifD*, welches für die α -Kette des Mo/Fe-Proteins kodiert, gerichtet waren. Die Sequenz dieser Primer wurde anhand der bekannten *nifD*-Sequenz von *Cyanothece* sp. ATCC 51142 und anderen stickstofffixierenden Cyanobakterien abgeleitet, und sollten ein Produkt von etwa 750 bp liefern.

Eine PCR von Sphaeroidkörper DNA mit einer Annealingtemperatur von 48,4°C und einer Elongationszeit von 1 min 15 sec lieferte ein spezifisches Amplifikat von 751 bp (Kneip, 2002).

Sequenzierung und anschließende BlastX-Analyse bestätigten, dass es sich um einen Abschnitt des *nifD*-Gens handelte. Das *nifD*-Fragment hatte in BlastX-Analysen die größte Ähnlichkeit zu cyanobakteriellen NifD-Proteinen.

Das *nifD*-Fragment wurde für weitere phylogenetische Untersuchungen eingesetzt. Des Weiteren sollte ein zusätzlicher Nachweis der Nitrogenase auf Protein-Niveau erfolgen.

3.6.1 Phylogenetische Analyse der NifD Aminosäuresequenz

Anhand der phylogenetischen Analysen der 16S rDNA Sequenz der Sphaeroidkörper konnte *Cyanothec* sp. ATCC 51142 als nächster freilebender Verwandter ermittelt werden. Um zu überprüfen, ob das in den PCR-Reaktionen mit Sphaeroidkörper-DNA amplifizierte *nifD*-Fragment seinen Ursprung im Sphaeroidkörper-Genom hat, wurde die ermittelte Aminosäuresequenz von NifD einer phylogenetischen Analyse unterzogen. Die Ergebnisse dieser Analyse mittels eines proteinkodierenden Gens dienen des Weiteren dazu, die 16S rDNA Bäume auf ihre Genauigkeit hin zu kontrollieren.

Die Sphaeroidkörper NifD-Sequenz wurden mit den NifD Proteinsequenzen von 13 weiteren stickstofffixierenden Bakterien aligniert und ein phylogenetischer Baum nach der *Minimum-evolution* Methode konstruiert (Pechtl et al., 2004). Abb. 3-11 zeigt das Ergebnis der phylogenetischen Analyse anhand der NifD-Aminosäuresequenzen.

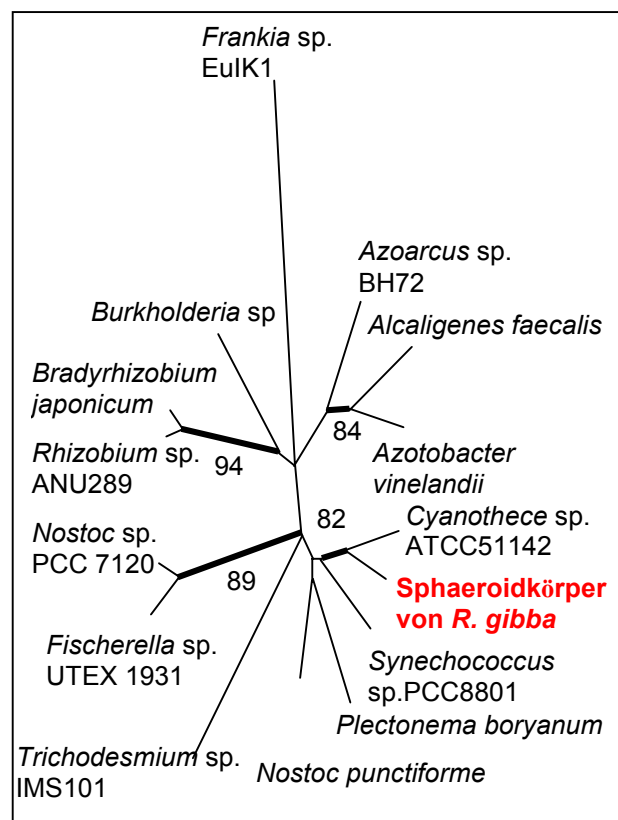


Abb. 3-11: Minimum-evolution Analyse anhand der NifD-Aminosäuresequenzen. Bootstrap Raten über 80% für innere Äste sind angegeben (aus Pechtl et al., 2004).

Wie in Abb. 3-11 zu sehen, konnte die phylogenetische Analyse von *NifD* die nahe Verwandtschaft der Sphaeroidkörper zu *Cyanothece* sp. bestätigen. Das Ergebnis zeigt weiterhin, dass es sich bei dem amplifzierten *nifD* um ein Sphaeroidkörper-Genfragment handelt, das heißt, *nifD* als Strukturgen der Nitrogenase auf der Sphaeroidkörper-DNA kodiert ist.

3.6.2 *In-situ* Lokalisation der Nitrogenase Fe/Mo-Untereinheit

Über PCR-Applikationen konnte aus der Sphaeroidkörper-DNA ein Abschnitt von *nifD* amplifiziert werden. BlastX und phylogenetische Analysen anhand der Nukleotid und Aminosäuresequenz bestätigten, dass es sich dabei um ein Fragment eines Sphaeroidkörper-spezifischen Strukturgens der Nitrogenase handelt.

Durch histologische Ansätze sollte das Nitrogenase-Enzym auf Proteinebene auch *in-situ* innerhalb Diatomeenzellen lokalisiert werden. Hierzu wurden *R. gibba* Zellen für elektronenmikroskopische Analysen eingebettet und Präparate geschnitten (Kap. 2.2.14). Zum Nachweis des Enzyms wurden die Ultradünnschnitte mit einem Antikörper, welcher spezifisch gegen die α -Untereinheit des Fe/Mo-Proteins des Nitrogenase-Komplexes gerichtet war, inkubiert. Zur Markierung diente ein Gold-gekoppelter Zweitantikörper (Kap. 2.1.9).

Abb. 3-12 zeigt das Ergebnis der *in-situ* Lokalisationsstudien gegen die Untereinheit des Nitrogenase-Komplexes.

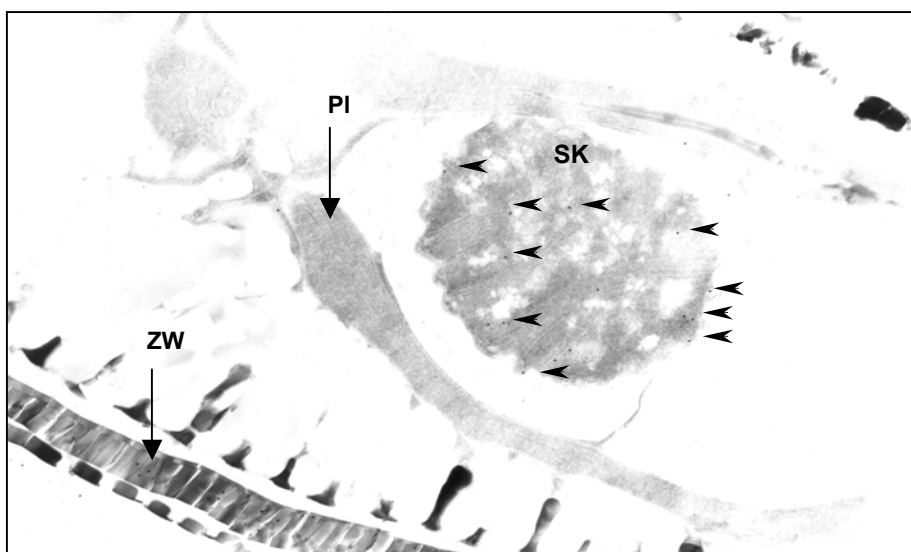


Abb 3-12: Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahme der *in situ*-Lokalisation der α -Untereinheit des Fe/Mo-Proteins in *R. gibba*-Zellen. Vergrößerung: 14280 x, 1.AK: 1:600, 2.AK: 1:140, SK: Sphaeroidkörper, Pl: Plastide, ZW: Zellwand, Einige der spezifischen Nitrogenase-Markierungen innerhalb des Sphaeroidkörpers sind mit Pfeilen gekennzeichnet.

Wie an den elektronenmikroskopischen Aufnahmen der *in situ*-Lokalisation des Nitrogenase Fe-Mo-Proteins als Faktor der Stickstofffixierung zu erkennen, zeigte sich innerhalb der Diatomeen die Goldmarkierung vorwiegend in den Sphaeroidkörpern. In verschiedenen Präparaten fanden sich pro Sphaeroidkörper zwischen 8 und 15 Signale. Anhand der Aufnahmen ließ sich nicht genau bestimmen, ob die Markierung an den internen Membranen der Sphaeroidkörper oder in deren plasmatischer Matrix vorliegt.

In einigen Präparaten fand sich auch eine sehr schwache Markierung von 1 bis 3 Goldpartikeln innerhalb der Plastide, hier handelt es sich um unspezifische Bindung des Antikörpers. Die Kieselsäureschale wies in den Präparaten meist ebenfalls Markierungen auf. Diese Signale traten auch in Kontrollexperimenten auf, in welchen nur der Gold-gekoppelte Zweitantikörper ohne Nitrogenase-spezifischen Erstantikörper verwendet wurde und sind auf die Struktur des Kieselsäurerüsts zurückzuführen, welche ein effektives Auswaschen der Antikörper nach der Inkubation verhindert.

3.7 UV/Vis-Spektroskopie an isolierten Sphaeroidkörpern

Durch phylogenetische Analysen anhand der Sphaeroidkörper-Gene der 16S rDNA sowie *nifD* konnten die Verwandtschaftsverhältnisse der Endosymbionten von *R. gibba* ermittelt werden. Als nächster freilebender Verwandter wurde *Cyanothece* sp. ATCC 51142 identifiziert. *Cyanothece* sp. gehört zur Gruppe der einzelligen, diazotrophen Cyanobakterien. In diesen Bakterien sind sowohl Nitrogenase-abhängige Stickstofffixierung als auch die Reaktionen der Photosynthese in derselben Zelle lokalisiert.

Die Sphaeroidkörper-Nitrogenase konnte sowohl auf genetischem Niveau als auch durch *in situ* Lokalisationsstudien nachgewiesen werden. Sowohl Sphaeroidkörper innerhalb der Wirtszelle als auch isolierte Endosymbionten zeigten in mikroskopischen Untersuchungen keine auf Photosynthese zurückzuführende Fluoreszenz (Abb. 3-1). Die Autofluoreszenz photosynthetisch aktiver Cyanobakterien und Plastiden ist auf die chromophoren Gruppen der Photosynthesepigmente zurückzuführen. Die Photosynthesepigmente sind auch verantwortlich für die Absorption von Licht unterschiedlicher Wellenlängen. Daher kann durch Analyse von Absorptionsspektren auf das Vorkommen bestimmter Pigmente geschlossen werden.

Um näher zu untersuchen, ob die Sphaeroidkörper Photosynthesepigmente enthalten, wurde die Absorption isolierter Endosymbionten durch UV/Vis-Spektroskopie analysiert. Als

Referenz diente dabei die Absorption photosynthetisch aktiver *Cyanothece* sp. ATCC 51142 Zellen. Abb. 3-13 zeigt die gemessene Absorption bei Wellenlängen von 280 bis 740 nm. Für die dargestellte Messung wurden Cyanobakterien und Sphaeroidkörper in Konzentrationen eingesetzt, welche eine identische Ausgangsabsorption bei 280 nm zugrundelegte. Weitere Messungen wurden mit Proben durchgeführt, welche die identische Anzahl an Zellen bzw. Sphaeroidkörpern enthielten. Diese Messungen lieferten Spektren derselben Form wie in Abb. 3-13 dargestellt, wobei *Cyanothece* in letzterem Fall insgesamt höhere Absorptionswerte zeigte.

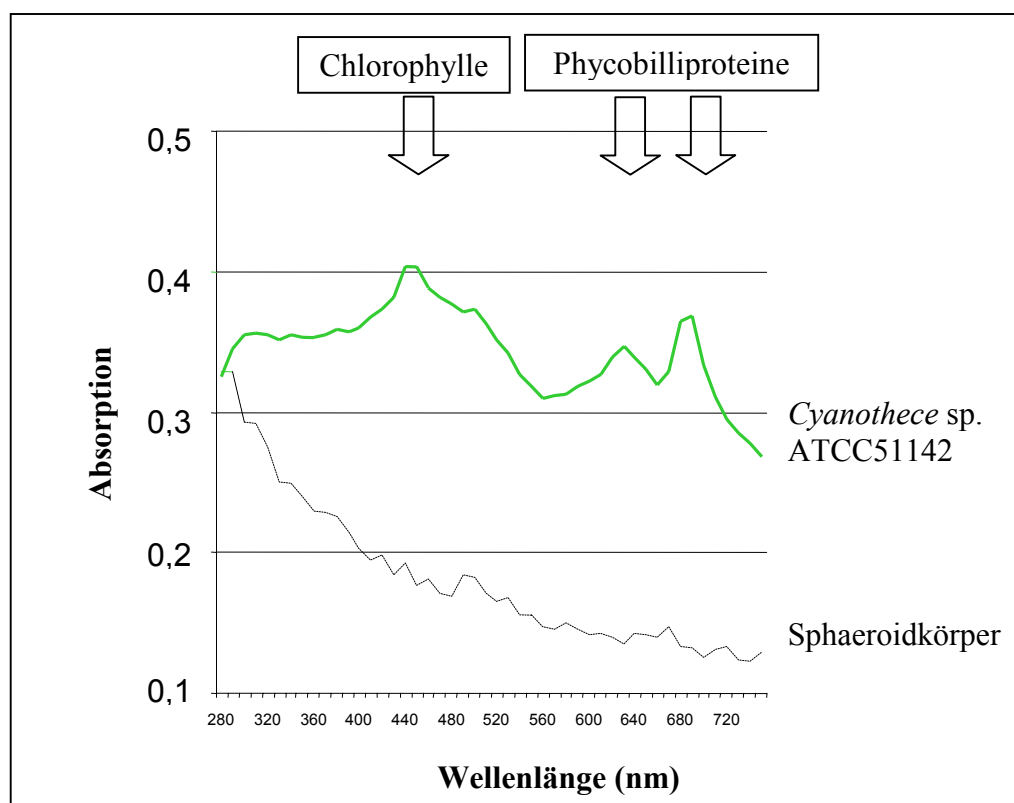


Abb. 3-13: UV/Vis-Absorptionsspektren von isolierten Sphaeroidkörpern und *Cyanothece* sp. ATCC 51142. Charakteristische Absorptionsmaxima photosynthetischer Pigmente sind angegeben.

Das in Abb. 3-13 dargestellte UV/Vis-Absorptionsspektrum von *Cyanothece* sp. ist charakteristisch für die Absorption photosynthetisch aktiver Cyanobakterien. Die Absorptionsmaxima bei 460nm, 650nm und 700nm sind deutlich zu erkennen.

Das Spektrum der Sphaeroidkörper zeigt kein derartiges Absorptionsverhalten, welches sich auf das Vorhandensein von Photosynthesepigmenten zurückzuführen wäre.

3.8 Genomanalyse von Sphaeroidkörpern und *Cyanothece* sp. ATCC 51142

In molekularbiologischen Experimenten konnte gezeigt werden, dass es sich bei den Sphaeroidkörpern von *R. gibba* um DNA-haltige Endosymbionten cyanobakteriellen Ursprungs handelt. Weiterhin konnten Bestandteile des katalytischen Systems zur Fixierung von molekularem Stickstoff innerhalb der Sphaeroidkörper nachgewiesen werden.

Zahlreiche Endosymbiosen zwischen Bakterien und Protisten bzw. höheren Organismen wurden in der Vergangenheit beschrieben (Kap. 1.3). Viele dieser Symbiosen nutzen dabei die Fähigkeit bestimmter Bakterien zur Stickstofffixierung. Derartige intrazelluläre bakterielle Assoziationen können verschiedene Ausprägungen haben bzw. sich in unterschiedlich fortgeschrittenen Stadien der symbiontischen Interaktion befinden. Diese Stadien einer intrazellulären bakteriellen Symbiose sind in 1.2.1 eingehend beschrieben.

Zur näheren Charakterisierung der *R. gibba*-Sphaeroidkörper Assoziation wurde ein Genom- bzw. Sequenzierprojekt initiiert. In diesem Projekt sollte zunächst ein größeres Fragment des Sphaeroidkörper-Genoms kloniert und sequenziert werden. Im Verlauf der Coevolution zwischen Wirt und bakteriellen Symbionten wurden zahlreiche genetische Modifikationen der Symbionten beschrieben, welche sie von ihren freilebenden Verwandten unterscheiden (Kap. 1.2.1). Die gewonnenen Sequenzdaten der Sphaeroidkörper wurden daher mit den korrespondierenden Sequenzbereichen ihres nächsten freilebenden Verwandten, *Cyanothece* sp. ATCC 51142, direkt verglichen und Gemeinsamkeiten sowie Unterschiede analysiert.

3.8.1 Herstellung von Fosmidbibliotheken

Um die Genome bzw. Genombereiche von Sphaeroidkörpern und *Cyanothece* sequenzieren zu können, mussten diese zunächst in klonierter Form in genomischen Bibliotheken vorliegen. Aufgrund der Möglichkeit, bis zu 45kbp große DNA-Inserts zu erhalten, wurden für die Klonierung Fosmide als Vektoren benutzt.

Die Herstellung der Fosmidbibliotheken aus gescherten gDNA-Fragmenten wurde in Kap. 2.2.8 vorgestellt. Genomische DNA wurde physikalisch geschert und katalytisch blunt-end Fragmente hergestellt, welche dann in den linearisierten Fosmidvektor pCC1FosTM ligiert wurden. Die Konstrukte wurden dann in Phagenpartikel verpackt und in phagenresistente *E. coli* Zellen transduziert.

Rekombinante Bakterienzellen wurden ausplattiert und die Anzahl an Kolonien bzw. Klonen der Fosmidbibliotheken ermittelt.

Um die Anzahl an Klonen einer Fosmidbibliothek zu errechnen, die nötig ist, um ein komplettes Genom statistisch zu repräsentieren, wurde folgende Formel verwendet (Sambrook et al., 1989):

$$N = \ln(1-P) / \ln(1-f)$$

In dieser Formel steht N für die Anzahl der repräsentativen Klone, P für die gewünschte Wahrscheinlichkeit, mit welcher eine DNA Sequenz in der Bibliothek vorhanden ist und f für die durchschnittliche Größe der klonierten DNA-Inserts in Abhängigkeit von der Gesamtgenomgröße.

Für die Berechnung wurden für die unbekannten Gesamtgenomgrößen der Sphaeroidkörper und von *Cyanothece* sp. ATCC 51142 die durchschnittliche Größe vollständig sequenzierter cyanobakterieller Genome von ca. 3 Mbp eingesetzt (Kaneko et al., 1996; Kaneko et al., 2001; Dufresne et al., 2003; Nakamura et al., 2003). Bei einer erwarteten durchschnittlichen Insertgröße von 40kbp und einer gewünschten Wahrscheinlichkeit von 99% ergab sich dadurch für beide Bibliotheken:

$$N = \ln(1 - 0,99) / (1 - [4 \times 10^4 / 3 \times 10^6]) = -4,61 / -0,013 = 355$$

Für eine Wahrscheinlichkeit von 99%, dass die Fosmidbibliotheken eine beliebige Sequenz der genomischen DNA enthielt, waren unter den angegebenen Parametern demnach 355 Klone mit Inserts von 40kbp nötig.

Die Fosmidbibliothek von Sphaeroidkörper-DNA lieferte ca. 40.000 Einzelklone, von denen 4.200 Kolonien in 96-Loch Mikrotiterplatten vereinzelt wurden. Die restlichen Kolonien wurden als Gesamtpool vereinigt und für spätere Analysen gelagert. Die Bibliothek, welche von *Cyanothece* sp. ATCC 51142 gDNA generiert wurde, ergab ca. 3.000 Klone, von denen 2.600 vereinzelt wurden.

Einzelne Fosmidklone beider Bibliotheken wurden über Pulsfeldgelelektrophorese auf ihre Insertgröße hin untersucht (nicht gezeigt). Die Analyse ergab Insertgrößen zwischen 35 kbp und 40 kbp.

3.8.2 Screening der Fosmidklone nach *nifD* und Sequenzierung positiver Klone

Die in Mikrotiterplatten vereinzelt Klone der Fosmidbibliotheken von Sphaeroidkörpern sowie *Cyanothece* wurden über Kolonie-PCR nach positiven Klonen für das Gen *nifD* gescreent. Hierzu wurden für die jeweiligen Organismen spezifische Primer gegen *nifD* verwendet. Um die Anzahl an benötigten PCR-Reaktionen für das *Screening* möglichst vieler Klone gering zu halten, wurden wie in Kap. 2.2.9.1 beschrieben zunächst gepoolte Klone jeder Mikrotiterplatte (96 Klone = Plattenpools), danach die Reihenpools jeder Platten mit positivem Amplifikat (je 8 Reihen/Platte = Reihenpool) und zur Identifizierung positiver Einzelklone alle Klone einer Reihe mit Amplifikat (je 12 Klone/Reihe = Einzelklone) über Kolonie-PCR analysiert. Fosmide, welche das Gen *nifD* enthielten, wurden ansequenziert und von den Insert-Enden Oligonukleotide für das *Screening* nach Folgeklonen abgeleitet.

Für die Identifizierung von Folgeklonen wurden außerdem Kolonie-Hybridisierungen wie in Kap. 2.2.9.2 beschrieben, durchgeführt.

Das *Screening* der Sphaeroidkörper-Bibliothek lieferte 2 *nifD*-positive Fosmidklone. Einer dieser Klone (Klon SKF13A12) wurde für die spätere Sequenzierung ausgewählt. 5'- bzw. 3'- Folgeklone wurden mittels PCR-*Screening* (Klon SKF20A4) und Koloniehybridisierung (Klon SKKH5A) ermittelt.

Die *Cyanothece*-Bibliothek lieferte mehrere *nifD*-positive Klone, von welchen einer (CyF4D10) für die spätere Sequenzierung verwendet wurde. Folgeklone (CyF3H7 und CyF9G6) wurden über PCR-*Screening* ermittelt.

Zur kompletten Sequenzierung der *nifD*-Fosmide sowie angrenzender, überlappender Klone mussten die Fosmidklone in Plasmid-Shotgunbibliotheken subkloniert werden. Hierzu wurde die Fosmid-DNA enzymatisch restringiert und in linearisierte pUC19 Vektoren ligiert. Des Weiteren wurden Fosmide physikalisch mittels Ultraschall geschert und Fragmente von 1.200 bis 1.500 bp Größe in den Vektor pEZSeqTM kloniert (Kap. 2.2.10).

Die Sequenzierung der Plasmide wurde wie in Kap. 2.2.5 beschrieben mit dem LICOR-System durchgeführt. Überlappende Sequenzen wurden zu sogenannten *Contigs* (*contiguous sequence*) zusammengefasst. Lagen nach Analyse der Plasmid-Sequenzen noch Lücken zwischen bestehenden *Contigs*, wurden diese über PCR-Reaktionen mit spezifischen Oligonukleotiden (Kap. 7.3) geschlossen. Abb. 3-14 gibt einen Überblick über das *Screening* nach ausgewählten Klonen, die Schritte der Subklonierung sowie die Vervollständigung der Sequenzdaten.

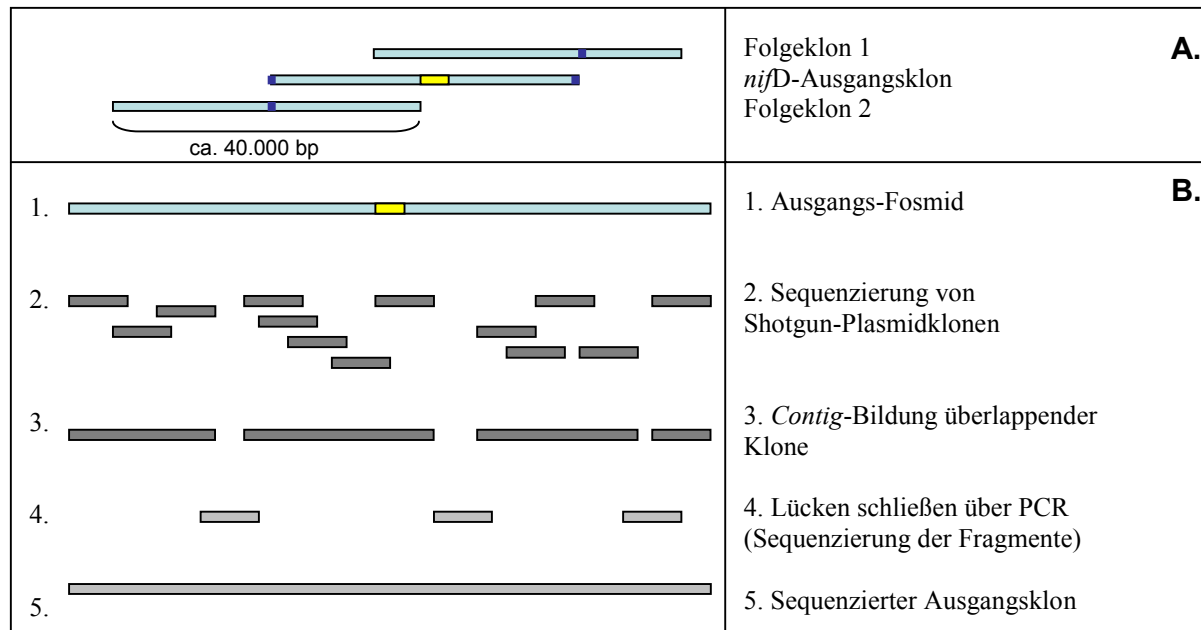


Abb. 3-14: Screening und Sequenzierung von ausgewählten Fosmidklonen

A. Screening von Folgeklonen anhand *nifD*-positivem Ausgangsfosmid, gelb: *nifD*, blau: PCR-Bereiche für Folgescreening, **B.** Klonierungs- bzw. Sequenzierungsstrategie von Fosmidklonen durch Sequenzierung von Shotgun-Plasmid-Bibliotheken

3.9 Sequenzanalyse der Genomfragmente von Sphaeroidkörpern und *Cyanothece* sp. ATCC 51142

Durch Screening nach *nifD* konnten sowohl aus der Sphaeroidkörper- als auch aus der *Cyanothece*-Fosmidbibliothek positive Klone identifiziert werden. Von diesen Ausgangsfosmiden wurden die terminalen Bereiche für das Screenen nach Folgeklonen eingesetzt. Dabei überlappten die beiden Sphaeroidkörper-Folgeklone miteinander, so dass eine komplette Sequenzabdeckung des *nifD*-Ausgangsklons gegeben war (Abb 3-14A). Die *nif*-Region der Sphaeroidkörper konnte daher über zwei Fosmidklone abgedeckt werden. Bei *Cyanothece* wurden, um die korrespondierenden Bereiche zur Sphaeroidkörpersequenz zu erhalten, insgesamt drei Fosmidklone sequenziert und analysiert.

Die vollständig sequenzierten *nif*-Regionen einschließlich flankierender Bereiche wurden auf kodierende Regionen bzw. Gene analysiert. Hierzu wurde das Programm *orf-finder* (Kap. 2.1.14) verwendet. Weitere Analysen dienten der Identifizierung von tRNA-Genen mittels *tRNA scan* (Kap.2.1.14).

In permanenten Endosymbionten findet im Verlauf der Evolution häufig eine Modifikation des Genoms statt. Mögliche Gründe für derartige genomische Veränderungen wurden in Kap. 1.2.1 beschrieben. Solche Modifikation umfassen die Reduktion der Genomgröße, eine

Tendenz zu A/T-reicheren Genomen sowie der Verlust von Genen durch Mutationen und Deletionen. Aufgrund der endosymbiontischen Natur der Sphaeroidkörper wurden die Sequenzen auch im Hinblick auf genetische Veränderungen hin analysiert.

3.9.1 Sequenzanalyse des Genomfragments von *Cyanothece* sp. ATCC 51142

Aus der Fosmidbibliothek von *Cyanothece* wurden insgesamt drei Fosmidklone (CyF4D10, CyF3H7, CyF9G6) vollständig sequenziert. Die Länge des komplett sequenzierten Genomfragments beträgt 63.362 bp und wurde in der Datenbank GenBank unter der *Accession*-Nummer AY728386 annotiert. Für die vollständige Sequenzabdeckung wurden 628 einzelne Shotgun-Plasmidklone sequenziert. Lücken zwischen den *Contigs* wurden über die Sequenzierung von insgesamt 11 verschiedenen PCR-Fragmenten geschlossen.

Durch Analysen aller 6 möglichen Leserahmen mittels der Programme *orf-finder* und *Sequencher* konnten 66 potentielle *open reading frames* (*orf*) bzw. Gene identifiziert werden. Die untersuchte Sequenz weist damit eine Gendichte von 1 Gen pro 960 bp auf, 19,5 % des Bereichs sind nicht-kodierend bzw. intergenisch. Gene für tRNAs innerhalb des analysierten Genomfragments wurden nicht gefunden. Der sequenzierte Genombereich enthält neben *nifD* zahlreiche weitere Gene, deren Produkte für die Stickstofffixierung nötig sind.

Der A/T-Gehalt der kompletten Sequenz liegt bei 60,22 %, wobei der Gehalt der kodierenden Bereiche 59,35 % und der der nicht-kodierenden, intergenischen Regionen 63,77 % beträgt. Durch Analyse der kodierenden Bereiche wurden des Weiteren die A/T-Häufigkeiten an allen drei Positionen der Codons proteinkodierender Gene ermittelt. Dabei liegen bei 49,51 % aller Codons A oder T an Position 1, an den Positionen 2 und 3 beträgt die Häufigkeit 61,40 % und 66,81 %.

Eine Übersicht über die Ergebnisse der Sequenzanalyse der *Cyanothece*-Fosmidklone gibt Tabelle 3-1.

Zur weiteren Analyse wurden die Sequenz sowie die kodierenden Bereiche mit dem Programm *CloneManager* visualisiert. Abb. 3-15 gibt einen Überblick über die *Cyanothece*-Sequenz und die einzelnen Gene sowie eine Übersicht der A/T-G/C-Verteilung des sequenzierten Bereichs.

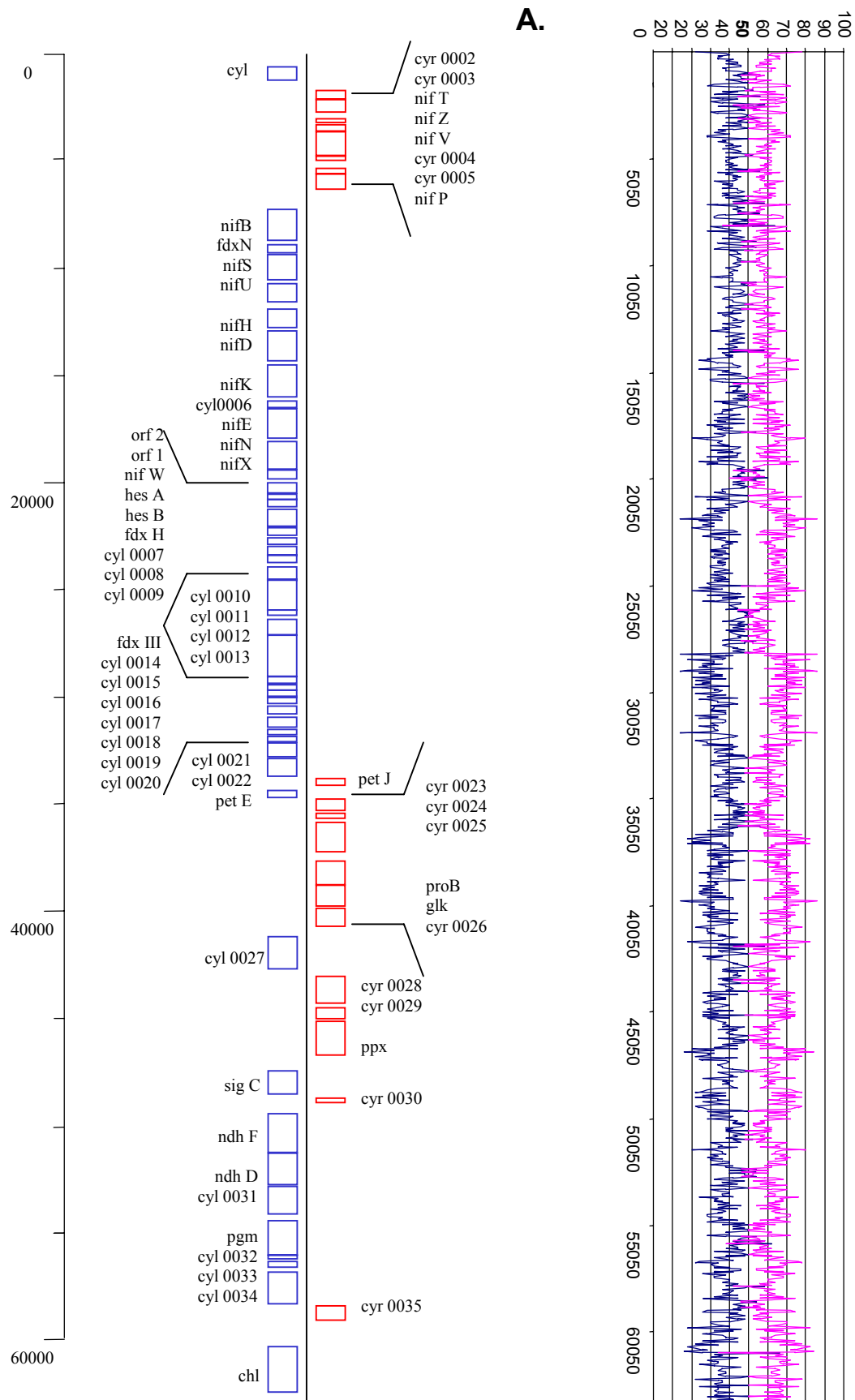


Abb. 3-15: Ergebnis der Sequenzierung und Analyse des Genomfragments von *Cyanothece* sp. ATCC 51142. A. Genkarte (Kodierende Bereiche sind als Kästen dargestellt, Blau: Leitstrang, Rot: Folgestrang), B. A/T-G/C-Verteilung (Blau: G/C, Rot: A/T). Nähere Erläuterung siehe Text.

In Abb. 3-15 A. sind alle 66 *open reading frames* bzw. Gene eingezeichnet, welche in der *Cyanothece*-Sequenz identifiziert wurden. Hierzu zählen 30 Gene, denen in Datenbank-Analysen eine Funktion zugeordnet werden konnte. Diese Gene sind mit den in den Datenbanken verwendeten Namen bzw. Abkürzungen bezeichnet. 36 *open reading frames* wurden identifiziert, welche für konserviert-hypothetische oder hypothetische Proteine kodieren. Als konserviert-hypothetisch wurden *orf's* für solche Produkte bezeichnet, welche in Datenbank-Analysen hohe Ähnlichkeiten zu cyanobakteriellen Sequenzen zeigten, denen jedoch bisher keine Funktion zugeordnet werden konnte. Die als hypothetische *orf's* bezeichneten Bereiche zeigten einen offenen Leserahmen, konnten jedoch keinen Datenbankeinträgen zugeordnet werden. *Orfs* für konserviert-hypothetische sowie hypothetische Proteine wurden, nach ihrer Kodierung auf Leit- oder Folgestrang, mit *cyl* bzw. *cyr* und einer fortlaufenden Nummer bezeichnet. Die in Abb. 3-15 A. schematisch dargestellten Gene und *orf's* sind nach ihrer Orientierung in blau bzw. rot gekennzeichnet.

Innerhalb der sequenzierten Fosmidklone von *Cyanothece* wurden zahlreiche cyanobakterielle *nif*-Gene identifiziert, darunter auch die Strukturgene der Nitrogenase, *nifH*, *nifD* und *nifK*. Weitere *nif*-Gene oder indirekt an der Stickstofffixierung beteiligten *orf's* liegen nah an die Strukturgene assoziiert. Upstream der *nif*-Region liegen zahlreiche weitere Gene mit unterschiedlichen Funktionen. Hierzu gehören ein *sigma*-Faktor der RNA-Polymerase II (*sigC*), zwei Untereinheiten der NADH Dehydrogenase (*ndhF*, *ndhD*) sowie zwei Gene für photosynthetische Proteine, *petJ* für das Cytochrom-c6 Protein sowie *petE* für einen Plastocyanin-Vorläufer. Auf weitere Gene wird im Zusammenhang mit der vergleichenden Sequenzanalyse näher eingegangen (Kap. 3.9.3).

An der schematischen Darstellung lässt sich erkennen, dass die Gendichte des analysierten Bereichs vergleichbar ist mit der Gendichte anderer cyanobakterieller Genome (Kaneko et al., 1996; Kaneko et al., 2001; Dufresne et al., 2003; Nakamura et al., 2003). Es konnten nur 3 große intergenische Bereiche identifiziert werden, welche eine Größe von über 500 bp aufweisen.

Der in Abb. 3-15 B. gezeigte Nukleotid-Plot stellt die Verteilung des A/T- und G/C-Gehalts des Sequenzbereichs dar (Rot: A/T, Blau: G/C). Der A/T-Gehalt der gesamten Sequenz beträgt 60,22%, wobei zu erkennen ist, dass der A/T-Gehalt im Bereich der *nif*-Region deutlich niedriger und konstanter ist als in dem darauf folgenden Bereich des Genomfragments.

Die Sequenzierung der *Cyanothece*-Fosmidklone lieferte damit einen Einblick in das Genom dieses Cyanobakteriums und bildete die Basis für die vergleichende Analyse mit dem korrespondierenden Genom-Bereich in Sphaeroidkörpern.

3.9.2 Sequenzanalyse des Sphaeroidkörper-Genomfragments

Die Fosmidbibliothek der Sphaeroidkörper von *R. gibba* lieferte nach dem *Screenen* drei Klone (SKKH5A, SKF13A12, SKF20A4), die für die Subklonierung und Sequenzierung verwendet wurden. Zur vollständigen Sequenzabdeckung wurden insgesamt 491 Plasmidklone und Fragmente aus 6 PCR-Reaktionen sequenziert und analysiert. Die Länge des vollständig sequenzierten Fragments der Sphaeroidkörper beträgt 51475 bp. Die Sequenz wurde in der Datenbank GenBank unter der *Accession*-Nummer AY728387 annotiert.

Innerhalb des analysierten Sphaeroidkörper-Genomfragments wurden insgesamt 47 Gene und *orf's* identifiziert. Die errechnete Gendichte beträgt 1 Gen pro 1095 bp bei einem Anteil von 29,5 % an nicht-kodierender DNA. Innerhalb des analysierten Bereichs konnten keine tRNA-Gene identifiziert werden.

Die Berechnung des A/T-Gehalts des Fragments ergab für die komplette Sequenz 62,8 %, wobei für kodierende Bereiche ein Gehalt von 58,33 % und für nicht-kodierende bzw. intergenische Bereiche ein Gehalt von 70,77 % ermittelt wurde.

Die Häufigkeiten von A und T an den verschiedenen Codonpositionen beträgt 48,16 % für Position 1, 61,89 % für Position 2 und 67,25 % für Position 3 eines Codons.

Eine Übersicht über das sequenzierte Fragment des Sphaeroidkörpergenoms, sowie die identifizierten kodierenden Bereiche gibt Abb. 3-16 A. Ebenfalls dargestellt ist der Gehalt an A/T- bzw. G/C in einem Nukleotid-Plot über den gesamten Sequenzbereich (Abb. 3-16 B.).

Gene bzw. *orf's* wurden, wie im *Cyanothece*-Projekt beschrieben, identifiziert und gekennzeichnet (Kap. 3.9.1). Gene konservierter, hypothetischer Proteine sowie hypothetische *orf's* wurden je nach Orientierung mit *sbl* (Leitstrang-kodiert) und *sbr* (Folgestrang-kodiert) sowie einer fortlaufenden Nummer benannt. In Abb. 3-16 wurde derselbe Maßstab wie im Schema des *Cyanothece*-Fragments verwendet.

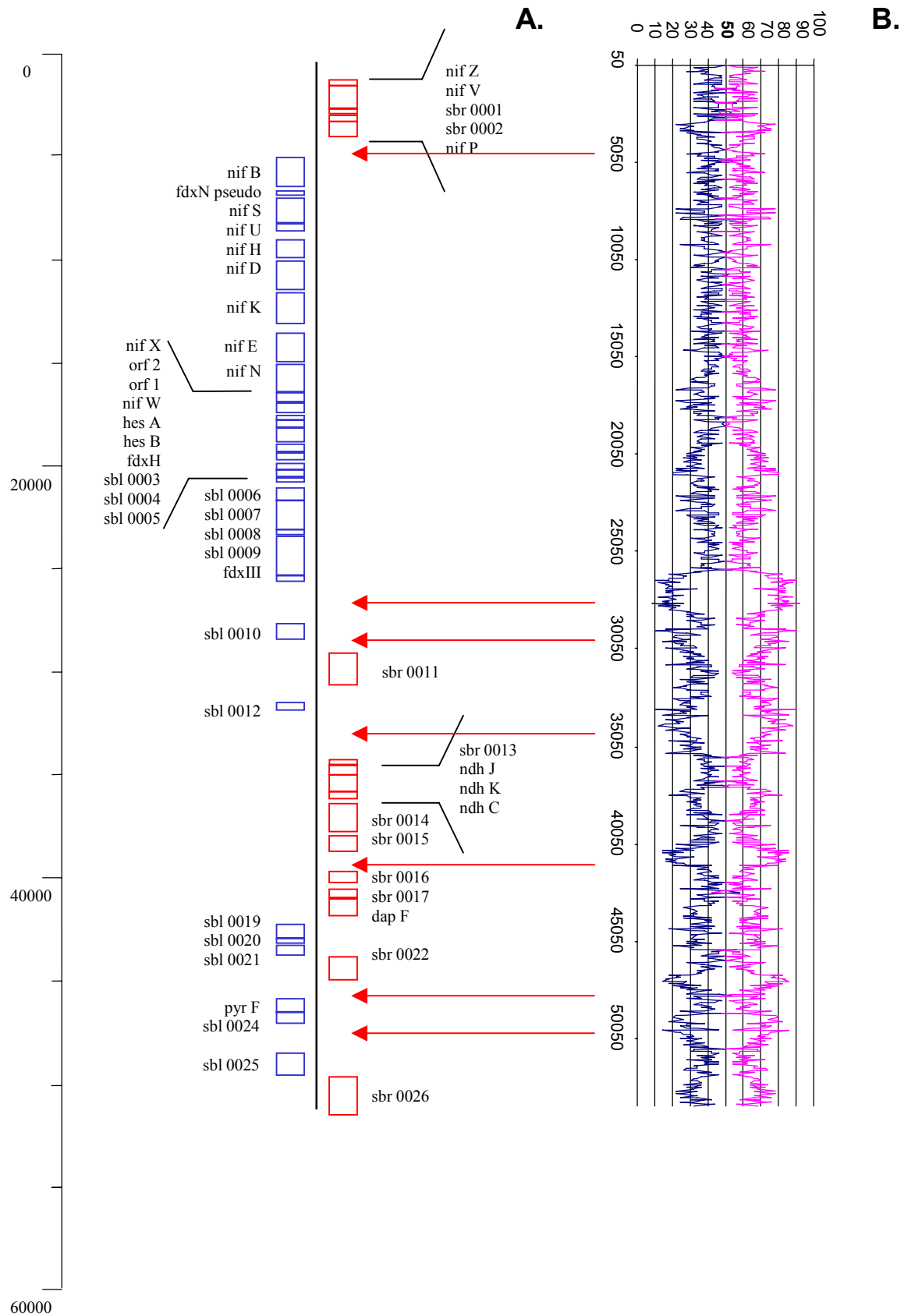


Abb. 3-16: Ergebnis der Sequenzierung und Analyse des Sphaeroidkörper Genomfragments.

A. Genkarte (Kodierende Bereiche sind als Kästen dargestellt, Blau: Leitstrang, Rot: Folgestrang), B. A/T-G/C-Verteilung (Blau: G/C, Rot: A/T). Rote Pfeile: A/T-reiche, nicht-kodierende Regionen. Nähere Erläuterung siehe Text.

Die schematische Darstellung in Abb. 3-16 A. zeigt den analysierten Genombereich der Sphaeroidkörper einschließlich identifizierter Gene bzw. *orf's* an. Insgesamt konnten 47 kodierende Bereiche identifiziert und analysiert werden, 24 Genen sind Proteine bekannter Funktion zugeordnet.

Der sequenzierte Bereich umfasst 13 cyanobakterielle *nif*-Gene, darunter auch die Strukturgene der Nitrogenase, *nifH*, *nifD* und *nifK*. Des Weiteren konnten auch zahlreiche Gene indirekt an der Stickstofffixierung beteiligter Proteine identifiziert werden. Alle *nif*-Gene sind dabei in einer bestimmten Region lokalisiert und folgen dicht aufeinander.

Upstream der *nif*-Genregion liegen zahlreiche Gene unterschiedlicher Funktion, darunter drei Untereinheiten der NADH Dehydrogenase (*ndhJ*, *ndhK* und *ndhC*) sowie die Orotidin 5'-Monophosphat-Decarboxylase (*pyrF*). Des Weiteren finden sich zahlreiche *orf's*, denen keine Funktion zugeordnet werden konnte. Auffallend an diesem auf die *nif*-Region folgenden Sequenzbereich ist die vergleichsweise geringe Gendichte. Es finden sich hier 6 nicht-kodierende Bereiche mit einer Größe von über 500 bp (NC-Regionen). Der A/T-Gehalt dieser NC-Regionen liegt zwischen 71,6 % und 78,4 %. Durch die Anzahl und Größe dieser Bereiche ergibt sich die bereits beschriebene geringe Gendichte innerhalb des analysierten Fragments, sowie der große Anteil nicht-kodierender DNA. Der in Abb. 3-16 B. dargestellte Nukleotid-Plot zeigt, dass der A/T-Gehalt in dem auf die *nif*-Region folgenden Bereich insgesamt erhöht ist, mit zusätzlich verstärkten Tendenzen zur A/T-Akkumulation in den NC-Regionen (Abb.3-16, rote Pfeile).

Durch Vergleich der *nif*-Region der Sphaeroidkörper von *R. gibba* mit der *nif*-Region des nächsten freilebenden Verwandten, *Cyanothece* sp. ATCC 51142, sollten im nächsten Schritt anhand der gewonnenen Daten die Unterschiede und Gemeinsamkeiten innerhalb der genomischen DNA-Sequenzen analysiert werden.

3.9.3 Vergleichende Analyse der sequenzierten Genombereiche der Sphaeroidkörper und *Cyanothece* sp. ATCC 51142

Ziel des Sequenzierprojekts an Sphaeroidkörpern und *Cyanothece* sp. war die vergleichende Analyse korrespondierender Genombereiche. Durch die Sequenzierung und anschließende Analyse der *nif*-Regionen sowie flankierender Bereiche beider Organismen sollten Merkmale untersucht werden, welche sich im freilebenden Cyanobakterium und in endosymbiontischen Sphaeroidkörpern unterscheiden.

In der allgemeinen Analyse der Genomfragmente wurden die Sequenzen von *Cyanothece* und Sphaeroidkörpern auf A/T-Gehalt, Codonusage und kodierende bzw. nicht-kodierende Bereiche hin untersucht. Tabelle 3-1 gibt einen Überblick über die ermittelten Daten aus der Analyse beider Organismen.

	<i>Cyanothece</i> sp. ATCC51142	Sphaeroidkörper
Analysiert	63362 bp	51475 bp
orfs	66 (1/960 bp)	47 (1/1095 bp)
Homologe Gene	29	29
Nicht-kodierend	19,5 %	29,5 %
AT-Gehalt gesamt	60,22 %	62,8 %
AT-Gehalt kodiert	59,35 %	58,33 %
AT-Gehalt nicht-kod.	63,77 %	70,77 %
Nukleotid-Häufigkeit an	1 Pos A/T: 49,51 %	1 Pos A/T: 48,16 %
Verschiedenen Codon-	2 Pos A/T: 61,40 %	2 Pos A/T: 61,89 %
Positionen	3 Pos A/T: 66,81 %	3 Pos A/T: 67,25 %
Intergenische Bereiche	3	7
> 500 bp	(958 bp;60,54 %/ 752 bp;67,55 %/	(1040 bp;64,8 %/ 2106 bp;78,4 %/
Länge; A/T-Gehalt	1274 bp;66,72 %)	1088 bp;75,4 %/ 2112 bp;73,5 %/
		1006 bp;73,6 %/ 934 bp;73,7 %/
		1478 bp;71,6 %)

Tab. 3-1: Zusammenfassung der allgemeinen Genomanalyse anhand der sequenzierten Bereiche von *Cyanothece* sp. und Sphaeroidkörpern

Der Vergleich der beiden sequenzierten Genomabschnitte zeigt eine etwas höhere Gendichte sowie einen geringeren Anteil nicht-kodierender DNA im analysierten *Cyanothece*-Fragment gegenüber der Sphaeroidkörper-Sequenz an. Auch im A/T-Gehalt sind Unterschiede festzustellen. So sind der A/T-Gehalt der kompletten Sequenz sowie vor allem der A/T-Gehalt nicht-kodierender Bereiche bei Sphaeroidkörpern erhöht. Innerhalb proteinkodierender Bereiche beider Organismen konnte kein wesentlicher Unterschied der Nukleotid-Zusammensetzung festgestellt werden.

Abb. 3-17 stellt schematisch die bereits analysierten Genombereiche beider Organismen einander gegenüber.

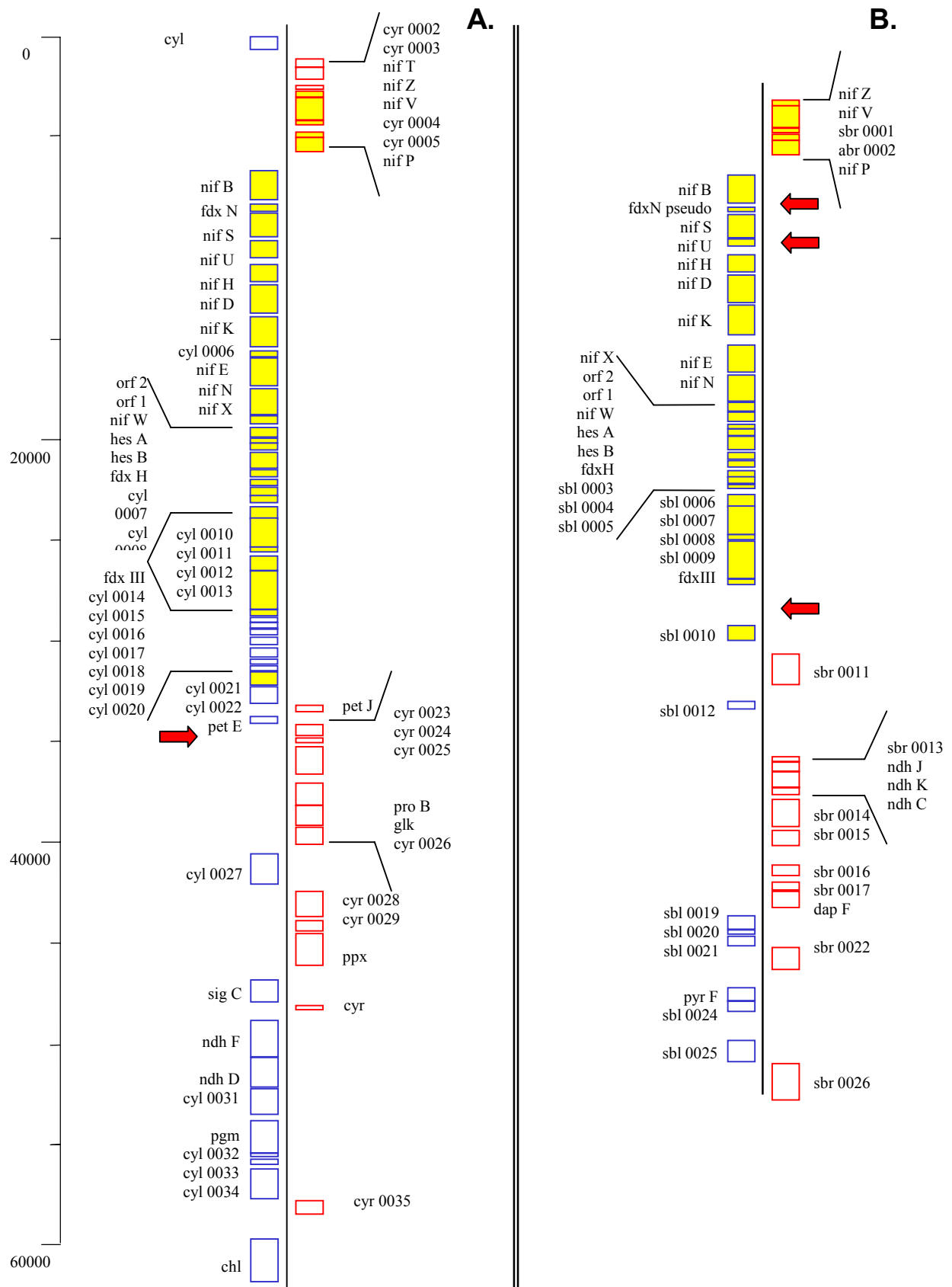


Abb. 3-17: Vergleichende Darstellung der sequenzierten Genomfragmente von *Cyanospora* sp. ATCC 51142 (A.) und Sphaeroidkörnern (B.). Homologe Gene sind gelb markiert. Pfeile kennzeichnen wesentliche Unterschiede zwischen den Sequenzen. Nähere Erläuterung siehe Text.

Die Darstellungen in Abb. 3-17 zeigen die in beiden Organismen identifizierten Gene bzw. *orf's* sowie die intergenischen Bereiche an.

Es fanden sich insgesamt 29 Gene und *orf's*, welche in den Genomfragmenten beider Organismen identifiziert werden konnten und einander homolog sind. Diese Gene sind in Abb. 3-17 gelb markiert. Hierzu gehören vor allem die konservierten cyanobakteriellen *nif*-Gene zur molekularen Stickstofffixierung, deren Abfolge in beiden analysierten Sequenzen gleich war. In Blast-Analysen wurden die homologen Genprodukte von *Cyanothece* und Sphaeroidkörpern miteinander verglichen. Es zeigte sich eine relativ hohe Ähnlichkeit in den Aminosäuresequenzen der Proteine, die durchschnittliche Ähnlichkeit der 29 Gene betrug 71,04 %. An den in Abb. 3-15 B. und Abb. 3-16 B. gezeigten Nukleotid-Plots ist zu erkennen, dass innerhalb der Regionen, welche für die verschiedenen *nif*-Gene kodieren, auch die Nukleotid-Verteilung in beiden Organismen annähernd gleich ist.

In dem auf die *nif*-Region folgenden Bereich finden sich größere Unterschiede zwischen den verschiedenen Genomfragmenten. Hier konnten keine homologen Gene identifiziert werden. In dieser Region zeigt sich ein wesentlicher Unterschied zwischen beiden Sequenzen. So ist in *Cyanothece* die Gendichte in dieser Region ähnlich hoch wie innerhalb der *nif*-Region. In den Sphaeroidkörpern weist dieser Bereich dagegen eine große Anzahl nicht-kodierender Regionen auf. In der gesamten *Cyanothece*-Sequenz konnten nur 3 intergenische Bereiche identifiziert werden, die größer als 500 bp sind. Diese Bereiche haben im Vergleich einen erhöhten A/T-Gehalt von bis zu 67,55 %. Dagegen konnten in den Sphaeroidkörpern insgesamt 7 solcher nicht-kodierenden Regionen identifiziert werden, welche einen A/T-Gehalt von bis zu 78,4 % zeigten. 6 dieser NC-Regionen liegen außerhalb der *nif*-Region.

Bei näherer Betrachtung einzelner Gene oder Sequenzbereiche zeigten sich weitere wesentliche Unterschiede zwischen den Sphaeroidkörpern und ihren nächsten freilebenden Verwandten.

So weist nur *Cyanothece* Gene für Proteine mit Funktionen in der Photosynthese auf, während in Sphaeroidkörpern keine Gene dieser Gruppe identifiziert werden konnten. Weiterhin zeigte sich, dass ein Gen der *nif*-Genregion, *fdxN*, innerhalb der Sphaeroidkörper nur als Pseudogen vorliegt und für kein translatierbares Protein kodiert (Kap. 3.10.1). Ein weiteres *nif*-Gen – *nifU* – ist in den Sphaeroidkörpern im Vergleich zu seinem homologen Gen in *Cyanothece* stark verkürzt (Kap. 3.10.2).

Weiterhin liegt innerhalb des *nif*-Genbereichs von *Cyanothece* eine von zwei konservierten Genen flankierte Region, in welcher mehrere *orf's* kodiert werden. Die konservierten Gene

finden sich auch in der Sphaeroidkörper-Sequenz, dazwischen liegt eine große, A/T-reiche Region, in welcher keine offenen Leserahmen identifiziert werden konnten (Kap. 3.10.3).

Um die genetischen Unterschiede zwischen *Cyanothece* und Sphaeroidkörpern näher zu untersuchen, wurden ausgewählte Regionen beider Genombereiche genauer analysiert.

3.10 Analyse ausgewählter Regionen der Genomfragmente

Die vergleichende Betrachtung der sequenzierten, korrespondierenden Fragmente der Genome von *Cyanothece* und den Sphaeroidkörpern diente der Untersuchung von gemeinsamen Merkmalen sowie der Identifikation von Unterschieden innerhalb der Sphaeroidkörper gegenüber ihren freilebenden Verwandten.

In ersten Analysen wurden mehrere Unterschiede zwischen den Sequenzen ermittelt. Hierzu gehörte innerhalb der Sphaeroidkörper die Veränderung von Genen, wie sie für *fdxN* und *nifU* beobachtet wurde, das Fehlen von Genen für photosynthetische Proteine sowie das vermehrte Auftreten großer, nicht-kodierender, A/T-reicher Regionen.

Zur näheren Charakterisierung dieser genetischen Modifikationen wurden bestimmte Regionen und Gene der Sphaeroidkörper-Sequenz näher untersucht.

3.10.1 Analyse des *fdxN*-Gens

Das Gen für FdxN, ein Ferredoxin-Protein, wird in *Cyanothece* von den Genen *nifB* und *nifS* flankiert. Der Leserahmen hat eine Länge von 360 bp und kodiert für ein Protein von 120 Aminosäuren.

In den Sphaeroidkörpern finden sich analog zur Situation in *Cyanothece* die konservierten Gene *nifB* und *nifS*, diese flankieren hier jedoch einen Bereich, der keinen offenen Leserahmen aufweist. Durch BalstN und BlastP Analysen dieses Bereichs konnten Sequenzhomologien zu *fdxN* von *Cyanothece* festgestellt werden. Abb. 3-18 zeigt das Ergebnis einer BlastP-Analyse der Aminosäuresequenz von *Cyanothece-fdxN* gegen drei möglichen Leserahmen des nicht-kodierenden Bereichs der Sphaeroidkörper. Gelb unterlegt sind Aminosäurebereiche, welche in beiden Organsimen gefunden wurden, rot markiert sind konservierte Cysteine des Ferredoxin-Proteins. Sterne innerhalb der Sphaeroidkörper-Sequenzen kennzeichnen eine Unterbrechung des Leserahmens durch ein Stop-Codon.

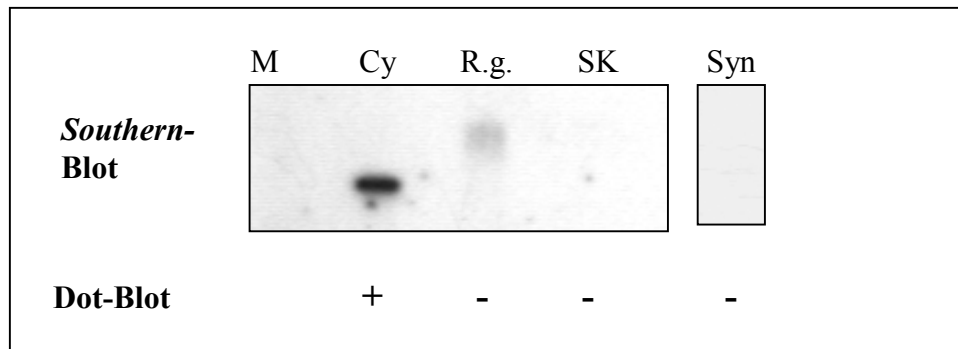


Abb. 3-19: Ergebnis der Southern- und Dot-Blot-Hybridisierungen genomischer DNAs mit [32 P]dCTP 5'-*nifU*-Sonde. M: Marker, Cy: *Cyanothece*, R.g.: *R. gibba*, SK: Sphaeroidkörper, Syn: *Synechocystis*

In Dot-Blot- und *Southern*-Hybridisierungen mit der 5'-*nifU*-Sonde konnte nur in *Cyanothece* ein spezifisches Signal detektiert werden. Auch in der *R. gibba* Gesamt-DNA-Probe zeigte sich in der *Southern*-Hybridisierung ein Signal, konnte jedoch nicht in Dot-Blot-Experimenten nachgewiesen werden. Sphaeroidkörper und *Synechocystis* DNA zeigten jeweils kein Hybridisierungssignal.

3.10.3 Analyse der *vap*-Region

Innerhalb der *nif*-Genregion von *Cyanothece* findet sich ein Bereich, welcher für mehrere *orf*'s kodiert und von dem Gen *fdxIII* und dem *orf cyl0021* flankiert wird. Zu den *orf*'s dieses Bereichs gehören unter anderem drei Gene für konservierte Proteine. So zeigten *cyl0014* und *cyl0015* Homologien zu sogenannten *virulence-associated proteins* (*vap*'s) und *cyl0017* zu einem konservierten Protein mit PIN-Domäne. Aus diesem Grund wurde diese, insgesamt 1627 bp umfassende Region als *vap*-Region bezeichnet. Wie in Abb. 3-20 zu erkennen, konnten das *fdxIII*-Gen ebenso wie ein zu *orf cyl0021* homologes Gen (*sbl0010*) auch innerhalb der Sphaeroidkörper-Sequenz identifiziert werden. Hier liegt zwischen diesen Genen ein 2106bp großer, nicht-kodierender Bereich mit einem erhöhten A/T-Gehalt von 78,4%.

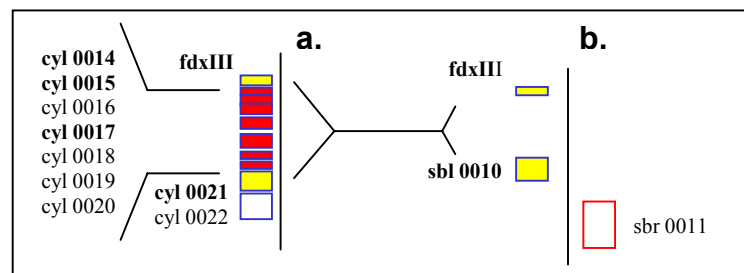


Abb. 3-20: *vap*-Region von *Cyanothece* (a.) und Sphaeroidkörpern (b.)

Anhand von Blast-Analysen konnten innerhalb des korrespondierenden Bereichs der Sphaeroidkörper keine homologen Regionen identifiziert werden, welche auf *vap*-Gene oder andere in *Cyanothece* lokalisierte *orf*'s hindeuten würden.

Um zu überprüfen, ob die in *Cyanothece* kodierten Gene an einer anderen Stelle des Sphaeroidkörper-Genoms lokalisiert sind, wurden *Southern*- und *Dot-Blot*-Hybridisierungen durchgeführt. Hierzu wurde der *Cyanothece-orf cyl0016* als radioaktiv-markierte Sonde eingesetzt. Abb. 3-21 zeigt das Ergebnis der Hybridisierungsexperimente.

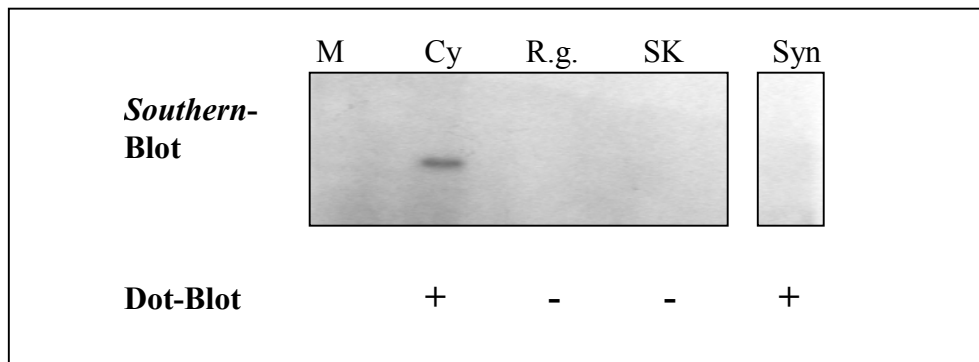


Abb. 3-21: Ergebnis der *Southern*- und *Dot-Blot*-Hybridisierungen genomischer DNAs mit [³²P]dCTP *cyl0016*-Sonde. M: Marker, Cy: *Cyanothece*, R.g.: *R. gibba*, SK: Sphaeroidkörper, Syn: *Synechocystis*

Die Hybridisierungen lieferten in *Southern*- und *Dot-Blot*- Experimenten in den *Cyanothece*-Proben ein spezifisches Signal der erwarteten Größe. Weder in *R. gibba* gesamt DNA noch in den Sphaeroidkörperfraktionen konnte ein Signal detektiert werden. Hybridisierungen mit *Synechocystis* gDNA ergaben in *Dot-Blot*-Hybridisierungen ein Signal, jedoch nicht in *Southern*-Hybridisierungen.

3.10.4 Analyse des *Plastocyanin*-Gens

Anhand morphologischer Analysen konnten weder bei Sphaeroidkörpern innerhalb der Wirtszelle noch bei isolierten Sphaeroidkörpern Hinweise auf Photosynthese-Aktivität gefunden werden. In mikroskopischen Untersuchungen zeigten die Endosymbionten keine Autofluoreszenz von Photosynthesepigmenten. Auch durch UV/Vis-Spektroskopie konnte in den Sphaeroidkörpern weder Absorption durch Chlorophyll und Phycobiliproteine nachgewiesen werden (Kap. 3.7).

Innerhalb der genomischen Sphaeroidkörper-Sequenz konnten keine Gene für Proteine mit photosynthetischen Funktionen identifiziert werden. Dagegen fanden sich in *Cyanothece* 2 solche Gene, *petJ* für Cytochrom c6 und *petE* für ein Plastocyaninprotein.

Um die Sphaeroidkörper auf das Vorhandensein von essentiellen photosynthetischen Genen zu überprüfen, wurden *Southern*- und *Dot-Blot*-Hybridisierungen gegen das Plastocyanin-Gen durchgeführt. Als heterologe, [32 P]-markierte Sonde diente dabei das *petE*-Gen aus *Cyanothece*. Abb. 3-22 zeigt die Ergebnisse der Hybridisierungsexperimente mit gDNA-Fraktionen verschiedener Organismen.

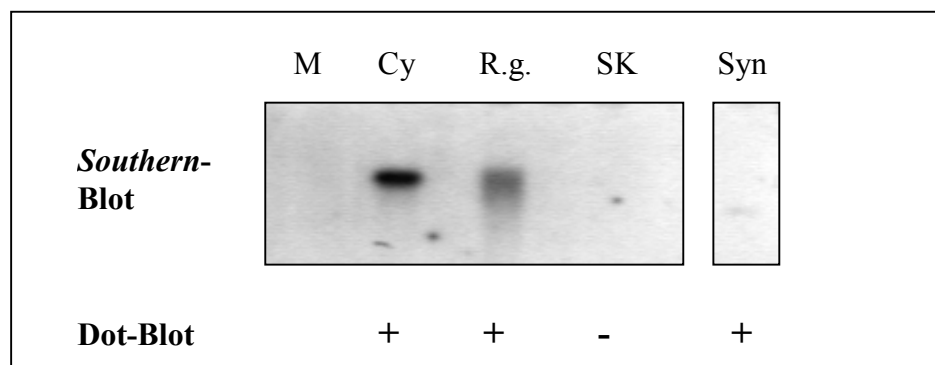


Abb. 3-22: Ergebnis der *Southern*- und *Dot-Blot*-Hybridisierungen genomischer DNAs mit [32 P]dCTP *petE*-Sonde. M: Marker, Cy: *Cyanothece*, R.g.: *R. gibba*, SK: Sphaeroidkörper, Syn: *Synechocystis*

In *Southern*-Hybridisierungen mit der *Cyanothece petE*-Sonde konnte in den gDNA-Fraktionen von *Cyanothece*, *R. gibba* und *Synechocystis* ein Signal detektiert werden. Die Sphaeroidkörperfraktionen zeigten keine Hybridisierung. In *Dot-Blot* Experimenten konnte das Ergebnis bestätigt werden.

3.11 Analyse von *recA* als Bestandteil des DNA-Reparatur-Systems

Durch vergleichende Analyse der Sphaeroidkörper-Sequenz mit dem korrespondierenden Genombereich in *Cyanothece* sp. konnten mehrere genetische Modifikationen innerhalb der Sphaeroidkörper festgestellt werden. Hierzu gehörte die Mutation von Genen zu Pseudogenen (*fdxN*), die Verkürzung von Genen (*nifU*), Genverlust (*vap*-Region, *petE*) sowie das Auftreten großer, nicht-kodierender, A/T-reicher Regionen (NC-Regionen).

In permanenten bakteriellen Endosymbionten, welche von der freilebenden Population isoliert sind, sind derartige deletierende Modifikationen und Mutationen häufig mit einem Verlust oder der Mutation von Genen assoziiert, deren Proteine an DNA-Reparaturmechanismen beteiligt sind. Aus diesem Grund wurde sowohl die *Cyanothece*- als auch die Sphaeroidkörper-gDNA auf ein zentrales Enzym der DNA-Reparatur, RecA, hin untersucht.

Durch PCR mit degenerierten Oligonukleotiden, welche anhand der *recA*-Sequenzen verschiedener Cyanobakterien abgeleitet worden war, konnten sowohl aus *Cyanothece* als auch aus Sphaeroidkörpern spezifische Fragmente einer Größe von 578 bp amplifiziert werden. Die Fragmente wurden kloniert und sequenziert. BlastX-Analysen der Sequenzen zeigte hohe Ähnlichkeit der Fragmente mit cyanobakteriellen *recA*-Genen. Um sicherzustellen, dass das aus Sphaeroidkörper-Fractionen amplifizierte *recA* seinen Ursprung in den Endosymbionten hat, wurden die Sequenzen phylogenetisch analysiert (nicht gezeigt). In den berechneten Stammbäumen konnte die nahe Verwandtschaft der Sphaeroidkörper-Sequenz zu *Cyanothece*, wie sie schon in den phylogenetischen Bäumen der 16S rDNA und von *nifD* beobachtet wurde, bestätigt werden.

Des Weiteren wurde die *recA*-Sequenz der Sphaeroidkörper auf Mutationen untersucht und mit *recA* von *Cyanothece* verglichen. In Abb. 3-23 ist ein Alignment der Aminosäuresequenzen beider RecA-Fragmente dargestellt.

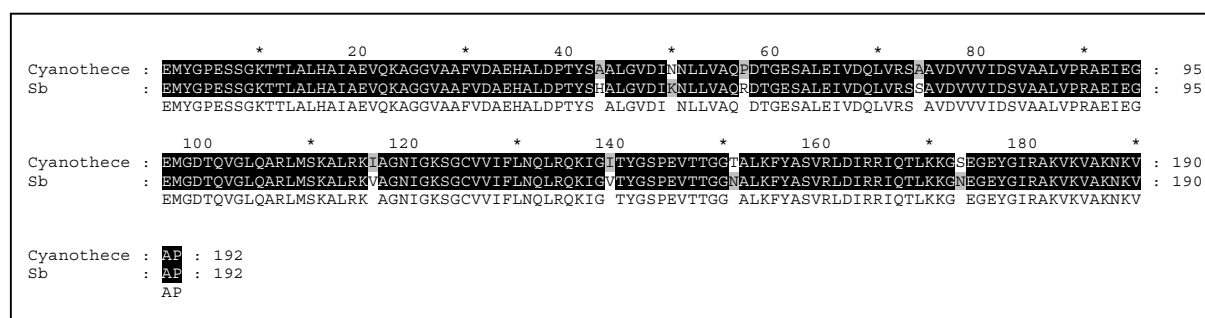


Abb. 3-23: Aminosäure-Alignment der RecA-Fragmente aus *Cyanothece* und Sphaeroidkörpern

Die Sequenzanalyse ergab eine große Ähnlichkeit zwischen *Cyanothece* und Sphaeroidkörper-recA. Innerhalb des sequenzierten Bereichs von recA aus Sphaeroidkörpern konnten keine Modifikationen wie Insertionen, Mutationen oder Deletionen festgestellt werden.

4 Diskussion

Schon in frühen morphologischen Untersuchungen an Diatomeen wurden die Sphaeroidkörper von *R. gibba* als ungewöhnliche zelluläre Einschlüsse von anderen eukaryoten Zellkompartimenten und Organellen abgegrenzt und eine mögliche bakterielle Herkunft diskutiert (Drum und Pankratz, 1964).

In dieser Arbeit konnte die endosymbiontische Natur der Sphaeroidkörper sowie deren cyanobakterielle Herkunft bewiesen werden (Prechtel et al., 2004). Des Weiteren wurden Gene des Nitrogenase-Enzymkomplexes innerhalb der Sphaeroidkörper nachgewiesen und diese als Ort der molekularen Stickstofffixierung bestimmt. Ein Sequenzierprojekt ermöglichte die Analyse vergleichbarer Genomfragmente von Sphaeroidkörpern und freilebenden Cyanobakterien. In diesem Zusammenhang wurden sowohl physiologische als auch genetische Modifikationen der Sphaeroidkörper identifiziert, welche Einblicke in die Evolution permanent intrazellulärer bakterieller Symbionten liefern.

4.1 Sphaeroidkörper als intrazelluläre Bakterien

Durch morphologische, physiologische sowie molekularbiologische Analysen an isolierten Sphaeroidkörpern sollte ein bakterieller Ursprung dieser ungewöhnlichen Zelleinschlüsse von *R. gibba* und deren mögliche Funktion untersucht werden.

Aus *R. gibba* wurden intakte Sphaeroidkörper isoliert und aufgereinigt. Aus dieser Sphaeroidkörper-Fraktion konnte hochmolekulare DNA präpariert werden (Kap. 3.4). Um zu überprüfen, ob diese DNA ihren Ursprung in den Sphaeroidkörpern hat, wurden verschiedene molekularbiologische und histologische Analysen durchgeführt. In PCR-Reaktionen mit 16S rDNA-Oligonukleotiden, welche spezifisch für eubakterielle 16S-Sequenzen waren, konnte aus der isolierten DNA-Fraktion ein Fragment amplifiziert und sequenziert werden. Sequenz-spezifische Oligonukleotid-Sonden wurden für den Nachweis der Template-DNA in *Southern*- und *in-situ* Hybridisierungen verwendet (Kap. 3.5.2). In *Southern*-Experimenten konnten mit der 16S rDNA-Sonde isolierte Sphaeroidkörper-DNA-Fractionen nachgewiesen werden. In Hybridisierungen an ganzen Diatomeenzellen konnte gezeigt werden, dass die Ausgangs-DNA nur innerhalb der Sphaeroidkörper lokalisiert ist (Abb. 3-8).

Diese Ergebnisse zeigen, dass die Sphaeroidkörper von *R. gibba* hochmolekulare DNA enthalten, die sich von den anderen DNA-Fractionen, die innerhalb der Diatomeenzelle

vorkommen, eindeutig abgrenzen lässt. Das Vorkommen von DNA bzw. eines Sphaeroidkörper-Genoms lieferte den Beweis für einen organismischen Ursprung der Sphaeroidkörper. Durch morphologische Untersuchungen konnte die Ähnlichkeit der Sphaeroidkörper zu Cyanobakterien gezeigt werden. Hierzu gehört die die Körper umgebende Doppelmembran sowie das Vorkommen von internen Membranen bzw. Membran-Invaginationen, welche an Thylakoide freilebender Cyanobakterien erinnern (Abb. 3-2).

Durch phylogenetische Analysen der 16S-Sequenz sowie weiterer Gene wurden die Verwandtschaftsbeziehungen der Sphaeroidkörper näher untersucht. Hierbei konnte die Verwandtschaft der Sphaeroidkörper zu Cyanobakterien bestätigt werden. In weiteren phylogenetischen Untersuchungen konnten die nächsten cyanobakteriellen Verwandten bestimmt werden. Die durch 16S-Analysen erlangten Ergebnisse wurden durch Untersuchungen anhand der Sequenz des proteinkodierenden Gens *nifD* verifiziert. Datenbank-Analysen der verschiedenen Gene, welche durch das Fosmid-Sequenzierprojekt identifiziert wurden, bestätigten den phylogenetischen Ursprung der Sphaeroidkörper.

In den durchgeführten Untersuchungen wurde das einzellige, diazotrophe Cyanobakterium *Cyanothece* sp. ATCC 51142 als der nächste freilebende Verwandte der Sphaeroidkörper identifiziert (Pechtl et al., 2004). Eine große Ähnlichkeit zeigte sich des Weiteren mit dem nicht näher charakterisierten Endosymbionten der tropischen Diatomee *Climacodium frauenfeldianum* (Carpenter und Janson, 2000).

Die Ergebnisse zeigen, dass es sich bei den Sphaeroidkörpern von *R. gibba* um Endosymbionten cyanobakterieller Herkunft handelt. Auch die Membranen, welche die Sphaeroidkörper vom Restcytoplasma der Wirtszelle abgrenzen, bestätigen den endosymbiontischen Charakter der Interaktion. So stellen die beiden inneren Membranen – SKM 1 und SKM 2 – die Reste der Plasmamembran und äußeren Membran des cyanobakteriellen Vorläufers dar. Die äußerste oder symbiontophore Membran ist auf die endocytobiotische Aufnahme des Bakteriums durch die Wirtszelle zurückzuführen.

4.2 Stickstofffixierung durch Sphaeroidkörper

Floener und Bothe konnten in Acetylen-Reduktionsassays zeigen, dass *R. gibba*-Zellen Nitrogenase-Aktivität aufweisen, das heißt, zur Fixierung von molekularem Stickstoff in der Lage sind (Floener und Bothe, 1980). Diese katalytische Fähigkeit der Diatomee konnte in

eigenen Reduktionsexperimenten reproduziert werden (Kap. 3.2). Da es sich bei den getesteten Zellen um ein neues Isolat von *R. gibba* handelt, kann ausgeschlossen werden, dass nur bestimmte Zellen eines Habitats oder einer Population zu dieser Stoffwechselleistung fähig sind.

Das Enzym Nitrogenase sowie die für die Fixierung nötigen Gene konnten bisher nur in Eu- und Archaeobakterien nachgewiesen werden (Zehr et al., 2000; Zehr et al., 2001). Eukaryote Zellen können molekularen Stickstoff nur dann nutzen, wenn sie mit solchen Bakterien mehr oder weniger eng symbiontisch assoziiert sind (Hellriegel und Wilfarth, 1888; Meeks und Elhai, 2002).

Für die Sphaeroidkörper konnte eine nahe Verwandtschaft zu diazotrophen Cyanobakterien der Gruppe *Cyanothece* sp. nachgewiesen werden. Molekularbiologische Analysen sollten klären, ob die in *R. gibba* gezeigte Nitrogenase-Aktivität auf die Sphaeroidkörper als Endosymbionten zurückzuführen ist. Ein Nachweis der Nitrogenase gelang sowohl auf genetischem Niveau als auch auf Proteinebene. So konnten innerhalb des sequenzierten Genomfragments der Sphaeroidkörper zahlreiche *nif*-Gene identifiziert werden (Kap. 3.9.2). Es fanden sich sowohl die Strukturgene der Nitrogenase-Untereinheiten, *nifH*, *nifD* und *nifK*, als auch diverse Gene indirekt an der Stickstofffixierung beteiligter Komponenten (Dean et al, 1993). Hierzu gehörten die Gene für *nifS* und *nifU*, welche der Biosynthese der Eisen-Schwefel-Cluster dienen, Cofaktoren für die Synthese der Fe/Mo-Proteine wie *nifB*/E/N/V/W sowie verschiedene Ferredoxin- und Transporter-Gene (Mulligan und Haselkorn, 1989; Huang et al., 1999). Ein Nachweis von Nitrogenase-Komponenten war auch auf Proteinebene erfolgreich und zeigte, dass das Enzym innerhalb der Sphaeroidkörper lokalisiert ist (Abb. 3-12).

Durch den Nachweis der Nitrogenase bzw. der *nif*-Gene innerhalb der Sphaeroidkörper konnte die Fähigkeit zur Stickstofffixierung von *R. gibba* den bakteriellen Endosymbionten zugeordnet werden. In der Literatur sind zahlreiche bakterielle Symbiosen mit Pflanzen und Protisten beschrieben (Meeks und Elhai, 2002; Stoebe und Maier, 2002). Bei einigen Interaktionen konnte gezeigt werden, dass die symbiontischen Bakterien den Wirten Stickstoff in gebundener Form zur Verfügung stellen und damit die Symbiose aufrechterhalten (Tab. 1-1).

In Sphaeroidkörpern innerhalb der Diatomeenzelle findet unter bestimmten Bedingungen die Fixierung von molekularem Stickstoff statt. Ob der Stickstoff in gebundener Form der Wirtszelle zur Verfügung gestellt wird, oder ob andere Stoffwechselprodukte der Symbiose dienen, konnte nicht eindeutig geklärt werden. Einige Beobachtungen sprechen dafür, dass die

Diatomeen direkt von der Stickstofffixierung der Sphaeroidkörper profitieren. So konnte *R. gibba* in Kulturmedium kultiviert werden, welches keinen Stickstoff in gebundener Form enthielt. Unter diesen Bedingungen zeigten die Algen keine Veränderung der Wachstumsrate oder Morphologie. Obgleich in den verwendeten unterschiedlichen Kulturbedingungen immer 4 Sphaeroidkörper pro Wirtszelle beobachtet wurden, konnte in anderen Experimenten gezeigt werden, dass die Anzahl der Endosymbionten unter Stickstoff-Mangelbedingungen zunimmt (DeYoe, 1992). Eine Kopplung von Nitrogenase-Aktivität der Sphaeroidkörper und Stickstoffangebot konnte von Floener und Bothe nachgewiesen werden (Floener und Bothe, 1980). Wird den Diatomeen Stickstoff als Ammonium oder Nitrat angeboten, nimmt die Fixierungsleistung der Zellen ab. Demnach könnte es regulatorische Mechanismen der Wirtszelle geben, welche die Nitrogenase-Aktivität der Sphaeroidkörper direkt oder indirekt beeinflusst.

Die Tatsache, dass die Fähigkeit zur Stickstofffixierung in den Sphaeroidkörpern erhalten geblieben ist, gibt Hinweise auf die wichtige Rolle dieses Stoffwechselwegs für die Symbiose. Die Fitness von Endosymbionten hängt nicht allein von ihrem eigenen „Erfolg“ ab, sondern auch von dem der Wirtszelle (Rispe und Moran, 2000). In diesem Fall könnte daher die Fähigkeit der Wirtszelle, unabhängig vom Angebot an gebundenem Stickstoff neue Habitate zu besiedeln und mit anderen Arten zu konkurrieren, den Nutzen der Symbiose darstellen.

4.2.1 Mechanismen zum Schutz der Nitrogenase

Das Enzym Nitrogenase ist labil gegenüber Sauerstoff (Fay, 1992; Gallon, 1992). Die Fixierung von molekularem Distickstoff kann sowohl von freilebenden als auch von symbiontisch assoziierten Bakterien nur unter Bedingungen durchgeführt werden, in denen die Sauerstoffkonzentration niedrig ist. Dies ist insbesondere für photosynthetisch aktive Organismen von Bedeutung, da während der Lichtreaktionen der Photosynthese durch die Photolyse von Wasser Sauerstoff freigesetzt wird. Die Sphaeroidkörper als stickstofffixierende Endosymbionten sind innerhalb einer photosynthetisch aktiven Zelle lokalisiert. Auch hier müssen Schutzmechanismen vorliegen, die eine effektive Nitrogenase-Aktivität der Symbionten erlauben.

Verschiedene Strategien zum Schutz der Nitrogenase haben sich im Laufe der Evolution entwickelt. Hierzu gehört die räumliche Trennung von Stickstofffixierung und Photosynthese in filamentösen Cyanobakterien. Hier findet die Fixierung nur in spezialisierten Zellen – den

Heterozysten – statt, die nur eine reduzierte Form der Lichtreaktion der Photosynthese aufweisen, und von Sauerstoff-bildenden Zellen durch verdickte Zellwände getrennt sind (Tel-Or und Steward, 1977; Bohme, 1998; Adams, 2000). Auch Bacterioide – symbiontisch in Knöllchen von Leguminosen lokalisierte Rhizobien – sind räumlich vor hohen Sauerstoffkonzentrationen geschützt (Werner, 1992). Hier findet sich auch Leghämoglobin, ein Molekül, welches aktiv Sauerstoff abfangen kann (Wittenberg, 1972). Solche Substanzen sind auch bei Cyanobakterien beschrieben worden und werden hier als Cyanoglobine bezeichnet (Hill et al., 1996). In einzelligen, diazotrophen Cyanobakterien ist keine räumliche Trennung der beiden Stoffwechselwege möglich. Hier findet man eine zeitliche Separierung (Bergman et al., 1997). Die Sauerstoff-bildenden Reaktionen der Photosynthese finden in der Hellphase, die Nitrogenase-abhängige Stickstofffixierung in der Dunkelphase statt. In der Dunkelphase wird die Sauerstoffkonzentration zusätzlich durch die Photorespiration erniedrigt. In bestimmten Cyanobakterien konnten weitere Stoffwechselwege - wie die Mehler-Reaktion und der Ascorbat-Glutathion-Zyklus - identifiziert werden, welche Sauerstoff verwerten und damit zu einem Schutz der Nitrogenase beitragen (Berman-Frank et al., 2001).

Als nächster freilebender Verwandter der Sphaeroidkörper konnte das diazotrophe Cyanobakterium *Cyanothece* sp. ATCC 51142 identifiziert werden. Dieses Bakterium zeigt die typische zeitliche Trennung von Photosynthese und Stickstofffixierung (Colón-López et al., 1997).

Sphaeroidkörper zeigten in Acetylen-Reduktionstests eine Licht-abhängige Nitrogenase-Aktivität (Abb. 3-3). Sie unterscheiden sich damit deutlich von ihren nächsten freilebenden Verwandten, welche nur in der Dunkelphase Stickstoff fixieren. Demnach ist in den Endosymbionten von *R. gibba* das Enzym Nitrogenase aktiv, während zur gleichen Zeit die Sauerstoff-bildenden Reaktionen der Photosynthese in der Plastide der Diatomee ablaufen.

Sphaeroidkörper sind durch drei Membranen vom Restcytoplasma der Wirtszelle getrennt. Zusätzlich finden die Lichtreaktionen der Photosynthese an den Thylakoidmembranen innerhalb der komplexen Plastide mit vier Hüllmembranen statt. Insgesamt sind die beiden Stoffwechselwege daher durch mindestens sieben Membranen voneinander getrennt. Diese räumliche Separierung könnte ausreichen, um die Sphaeroidkörper-Nitrogenase vor zu hohen Sauerstoffkonzentrationen in der Lichtphase zu schützen. Des Weiteren zeigen die Sphaeroidkörper selbst keine photosynthetische Aktivität. Es konnten fluoreszenzmikroskopisch sowie spektroskopisch keine Photosynthesepigmente nachgewiesen werden (Abb. 3-13). Die Genomanalyse ergab, dass zumindest ein essentielles Protein der

Lichtreaktionen der Photosynthese – Plastocyanin – nicht von den Endosymbionten kodiert wird (Kap. 3.10.4). Die Tatsache, dass die Endosymbionten in der Hellphase vermutlich keine Sauerstoff-bildenden Reaktionen durchführen, ermöglicht demnach bei gleichzeitiger räumlicher Trennung der Endosymbionten von O₂-bildenden Reaktionen der Wirtszelle eine Licht-abhängige Nitrogenase-Aktivität. Eine weitere Möglichkeit wäre die limitierte Fähigkeit der Sphaeroidkörper zur aeroben Stickstofffixierung. So wird beispielsweise für alle Stämme der Gruppe *Cyanothece* in der Literatur die Fähigkeit beschrieben, Stickstoff sowohl unter anaeroben als auch unter aeroben Bedingungen zu fixieren (Berman-Frank, 2003). Dabei könnten auch Stoffwechselwege wie beispielsweise die Mehler-Reaktion dazu beitragen, die Sauerstoffkonzentration innerhalb der Sphaeroidkörper während der Lichtphase niedrig zu halten.

Des Weiteren stellen die lichtabhängige Nitrogenase-Aktivität und ein Fehlen der Photosynthese in Sphaeroidkörpern bereits wichtige physiologische Anpassungen der Bakterien an die endosymbiontische Lebensweise innerhalb der Diatomee dar und werden in diesem Zusammenhang in Kap. 4.3 näher erläutert.

4.3 Anpassung der Sphaeroidkörper an die endosymbiontische Lebensweise

Die Sphaeroidkörper von *R. gibba* sind endosymbiontische Cyanobakterien, welche innerhalb der Wirtszelle molekularen Stickstoff fixieren. In phylogenetischen Untersuchungen konnten als nächste Verwandten freilebende, diazotrophe Cyanobakterien der Gruppe *Cyanothece* sp. identifiziert werden.

Demnach hat die Diatomee im Verlauf der Evolution ein freilebendes unizelluläres Cyanobakterium in einem phagocytotischen Vorgang aufgenommen. Das Bakterium wurde innerhalb der Wirtszelle als Endosymbiont etabliert. Eine solche endosymbiontische Lebensweise führt während der Coevolution beider Partner zu Anpassungen von Symbiont und Wirt. Hiervon sind vor allem die bakteriellen Symbionten betroffen, die sich durch ihre Lokalisation innerhalb einer eukaryoten Zelle physiologisch adaptieren müssen. Derartige Vorgänge gehen einher mit unterschiedlichen genomischen Modifikationen, wie sie beispielsweise bei symbiontischen Bakterien von Insekten beschrieben wurden (Wernegreen, 2002).

Bei den endosymbiontischen Sphaeroidkörpern konnten verschiedene Merkmale festgestellt werden, in denen sie sich von ihren freilebenden Verwandten unterscheiden und eine Anpassung an die intrazelluläre Lebensweise darstellen.

4.3.1 Lichtabhängige Stickstofffixierung und Verlust der Photosynthese-Aktivität in Sphaeroidkörpern

Zu den endosymbiotischen Anpassungen der Sphaeroidkörper gehört die bereits beschriebene lichtabhängige Nitrogenase-Aktivität. Freilebende, diazotrophe Cyanobakterien fixieren nur in der Dunkelphase Stickstoff, was auf die zeitliche Trennung gegenüber den Photosynthesereaktionen zurückzuführen ist. Sphaeroidkörper führen keine Photosynthese mehr durch. Diese Fähigkeit freilebender Cyanobakterien könnte im Verlauf der symbiontischen Evolution verloren gegangen sein. Der Verlust kann unterschiedlich erklärt werden. Zum einen wäre ein photosynthetisch aktiver Endosymbiont nicht zum Nutzen einer bereits selbst photosynthetisch aktiven Wirtszelle, da beide Organismen in diesem Fall um Licht und CO₂ konkurrieren würden. Aus demselben Grund zeigen auch die symbiontischen Cyanobakterien von *Azolla* oder *Gunnera* eine im Vergleich zu freilebenden Formen reduzierte Photosyntheseaktivität und CO₂-Fixierungsrate (Kaplan und Peters, 1988; Soderback und Bergmann, 1992). Eine weitere Erklärung ergibt sich aus der Etablierung der Symbiose. Freilebende Cyanobakterien nutzen die Photosynthese zur Gewinnung von Energie durch ATP-Bildung sowie der darauffolgenden Synthese von Kohlehydraten. Eine solche Energiegewinnung könnte für die Sphaeroidkörper hinfällig geworden sein, da sie möglicherweise durch die Wirtszelle mit der nötigen Energie für Stoffwechselprozesse versorgt werden. In symbiontischen Interaktionen ist eine derartige Energieversorgung des Endosymbionten durch die Wirtszelle häufig. So erhalten sich entwickelnde sowie reife Bacterioide von der Wirtspflanze Nährstoffe in Form von Dicarboxylsäuren und Spurenelementen (Udvardi und Day, 1997), die Pilzsymbionten der arbusculären Mycorrhiza werden mit Hexosen versorgt (Pfeffer et al., 1999).

Eine Energieversorgung der Sphaeroidkörper durch die Diatomee könnte auch die lichtabhängige Nitrogenase-Aktivität erklären. Unter Umständen kann die Wirtszelle die Endosymbionten nur dann mit genügend Nährstoffen bzw. Energie versorgen, wenn die energieliefernden Schritte der Photosynthese ablaufen. Da es sich bei der Fixierung von molekularem Stickstoff um eine sehr Energie-konsumierende Reaktion – 16 mol ATP pro mol fixierter N₂ – handelt, könnte die Durchführung von Stickstofffixierung und Photosynthese

zur selben Zeit für eine effektive Versorgung der Sphaeroidkörper nötig sein. Im Gegenzug könnte der Diatomee der fixierte Stickstoff in Form von NH_3 oder Aminosäuren von den Sphaeroidkörpern zur Verfügung gestellt werden, wie in Kap. 4.2 diskutiert.

Derartige Wechselbeziehungen zwischen Wirt und Symbiont erfordern eine Regulation der Stoffwechselprozesse. Solche regulatorischen Mechanismen finden sich auch bei der Sphaeroidkörper-*Rhoplaodia*-Symbiose. So fixieren die Endosymbionten nur dann effektiv Stickstoff, wenn den Diatomeen im umgebenden Medium keine andere Stickstoffquelle in Form von NO_3^- oder NH_4^+ zur Verfügung steht (Floener und Bothe, 1980). Weiterhin wurde beschrieben, dass sich die Anzahl der Sphaeroidkörper innerhalb der Wirtszelle unter Stickstoffmangelbedingungen erhöht (DeYoe, 1992). Das Stickstoffangebot im Medium kann nur von der Wirtszelle detektiert werden, dennoch hat es Einfluss auf Anzahl und Stoffwechselaktivität der Endosymbionten. Es müssen also Signalwege existieren, welche der Wirtszelle eine Regulation des Sphaeroidkörper-Stoffwechsels erlauben.

4.3.2 Kontrolle des Zellzyklus der Sphaeroidkörper

Neben den mit der molekularen Stickstofffixierung der Sphaeroidkörper einhergehenden Modifikationen lassen sich an den Endosymbionten von *R. gibba* weitere Veränderungen beobachten, die sie von freilebenden Cyanobakterien abgrenzen.

Jede *R. gibba*-Zelle beinhaltet stets eine definierte Anzahl an Endosymbionten. Unter den in dieser Arbeit beschriebenen Kulturbedingungen waren 4 Sphaeroidkörper pro Wirtszelle vorhanden, die Anzahl kann bei Stickstoffmangel jedoch auf 8 Körper pro Zelle ansteigen (DeYoe, 1992). Eine derartige, Milieu-abhängige Vermehrung der Sphaeroidkörper konnte in dieser Arbeit nicht nachgewiesen werden. Dennoch lässt sich vermuten, dass die Diatomee regulatorisch auf die Zellteilung der Endosymbionten einwirkt.

Freilebende Cyanobakterien teilen sich je nach Spezies und Umweltbedingungen alle 6 bis 48 Stunden in der exponentiellen Phase des Wachstums (Kondo et al., 1997). Unter den verwendeten Kulturbedingungen verdoppelte sich die Anzahl der Sphaeroidkörper jeweils nur kurz vor der Zellteilung der Wirtszelle, so dass jede Tochterzelle wieder eine identische Anzahl an Endosymbionten enthielt. Daher ist zu vermuten, dass die Teilung der Sphaeroidkörper direkt oder indirekt an die Zellteilung der Wirtszelle gekoppelt ist.

Eine Teilungskontrolle der cyanobakteriellen Symbionten wurde auch in anderen Assoziationen beschrieben. So ist das Wachstum von *Nostoc*-Zellen, welche symbiontisch mit

Anthoceros assoziiert sind, proportional zur Wachstumsrate des pflanzlichen Wirts (Enderlin und Meeks, 1983).

Physiologisch ist in der Sphaeroidkörper-*Rhopalodia*-Symbiose eine Teilungskontrolle durch die Wirtszelle nötig, da zu langsames Wachstum zu einem Verlust der Endosymbionten führen könnte und bei zu schneller, ungehinderter Teilung der Wirt mit dem Symbionten um Nährstoffe konkurrieren müsste. Weitere Untersuchungen müssen zeigen, durch welche Mechanismen die Teilung der Sphaeroidkörper kontrolliert wird und welche regulatorischen Prozesse daran beteiligt sind.

4.3.3 Transversale Weitergabe der Sphaeroidkörper

Pro Diatomeen-Zelle fanden sich unter den Standard-Kultivierungsbedingungen immer 4 Sphaeroidkörper, deren Anzahl vor der Teilung der Wirtszelle verdoppelt wurde. Jede Tochterzelle erhielt demnach wieder 4 Endosymbionten. Die Sphaeroidkörper lagen in diesem Prozess immer innerhalb des Cytoplasmas der Wirtszelle. Eine derartige vertikale Art der Weitergabe der Symbionten von der Eltern- zur Tochtergeneration wird als transversale Übertragung bezeichnet.

Bakterielle Symbionten müssen nicht zwangsläufig vertikal von Generation zu Generation weitergegeben werden. In der *Rhizobien*-Leguminosen-Symbiose muss jede Pflanze neu in Interaktion mit den Bakterien treten und die Bildung von Knöllchen und Bacteroiden induzieren (Pawlowski und Bisseling, 1996). Dasselbe trifft für die intrazelluläre *Nostoc-Gunnera*-Symbiose sowie zahlreiche extrazelluläre Cyanobakterien-Assoziationen zu (Meeks und Elhai, 2002).

In vielen symbiontischen Interaktionen mit Bakterien hat sich im Verlauf der Evolution ein Mechanismus entwickelt, welcher eine direkte Übertragung der Symbionten auf die Tochtergeneration erlaubt. In einzelligen Wirten kann diese Übertragung während der Zellteilung geschehen, wie bei den epibiontischen Bakterien einiger Diatomeen (Smith und Douglas, 1987). Extrazelluläre Cyanobionten von *Azolla* werden über Megasporen an die Tochtergeneration weitergegeben (Raven, 2002). Ungewöhnlichere Wege der vertikalen Übertragung haben sich bei den verschiedenen obligaten Symbiosen zwischen Bakterien und Insekten entwickelt. In diesen Assoziationen liegen die Bakterien in speziellen symbiontischen Organen oder Zellen vor. *Buchnera* sp., die Endosymbionten von Blattläusen, besiedeln die nächste Generation über die Infektion befruchteter Eier innerhalb des

Wirtsorganismus (Transovariale Übertragung) (Wernegreen, 2002). Die Symbionten von Tse-Tse Fliege - *Wigglesworthia* sp. – gelangen über die Nahrungsflüssigkeit, mit welcher die sich intracorporal entwickelnden Larven versorgt werden, zur nächsten Generation (Aksoy, 2000). Die Tatsache, dass die Endosymbionten von *R. gibba* direkt von Generation zu Generation weitergegeben werden, hatte im Verlauf der Evolution auch Effekte auf die Populationsstruktur der Sphaeroidkörper. Die ehemals freilebenden Cyanobakterien waren nach der Etablierung der Endosymbiose durch die vertikale Übertragung von der restlichen, freilebenden Population isoliert. Dies führte zur Ausbildung sogenannter *bottleneck*-Populationen, welche keinen freien Austausch genetischer Information zwischen den Bakterien mehr erlauben (Mira und Moran, 2002). An diesen sexuell isolierten Endosymbionten lassen sich häufig durch verschiedene Prozesse hervorgerufene Veränderungen des Genoms feststellen. Derartige Modifikationen wurden auch in den analysierten Sequenzen der Sphaeroidkörper identifiziert und werden in Kap. 4.5.3/4.5.4 näher besprochen.

4.4 Status der Sphaeroidkörper-*Rhopalodia*-Symbiose

Die Sphaeroidkörper von *R. gibba* sind cyanobakterielle Endosymbionten (Cyanobionten), welche innerhalb der Wirtszelle molekularen Stickstoff fixieren. Dies konnte durch morphologische, physiologische sowie molekularbiologische Analysen gezeigt werden.

Symbiosen zwischen Cyanobakterien und verschiedenen Wirtsorganismen sind in der Natur häufig. Cyanobionten finden sich assoziiert mit einer Vielzahl von Pflanzen und Pilzen (Bergman et al., 1992; Ow et al., 1999; Hill, 1975; Meeks, 1990), aber auch mit Protisten wie Diatomeen (Geitler, 1977) und Dinoflagellaten (Schnepf, 1992). Dabei kann die Ausprägung der Interaktion bzw. der Status der Symbiose sehr unterschiedlich sein. Die symbiontischen Interaktionen reichen von extrazellulären Assoziationen über epibiontische Lebensweise bis hin zu intrazellulären, spezifischen Symbiosen. Gemeinsam ist diesen Interaktionen, dass sowohl der Wirt als auch die symbiontischen Bakterien ihre Eigenständigkeit behalten. Während der Etablierung der Symbiose treten zwar diverse Modifikationen der Cyanobionten auf, diese bewegen sich jedoch im Rahmen der Veränderungen, welche auch in freilebenden Formen vorkommen können (Meeks und Elhai, 2002). Diese Autonomie schlägt sich auch darin nieder, dass die Bakterien nicht obligat an ihre Wirtszellen gebunden sind und *vice versa*, sondern beide Organismen auch ohne Symbiosepartner überleben können. Auch die

Rhizobien-Leguminosen-Symbiose, in welcher eine stärkere Modifikation beider Partner zu beobachten ist, stellt eine fakultative Interaktion dar.

Durch die Untersuchungen an *R. gibba* und der Sphaeroidkörper konnte der Status dieser Cyanobakterien-Symbiose genauer analysiert werden.

In *Rhopalodia*-Kulturen unter Laborbedingungen sowie in Umwelt-Isolaten konnten keine Diatomeen identifiziert werden, denen Sphaeroidkörper als Endosymbionten fehlten. Des Weiteren konnten isolierte Endosymbionten nicht außerhalb der Wirtszelle kultiviert werden, auch wenn ihnen alle Nährstoffe, welche für Wachstum und Entwicklung nötig sind, in verschiedenen Verbindungen und Konzentrationen zur Verfügung standen. Diese Beobachtungen deuten darauf hin, dass beide Symbiosepartner obligat aufeinander angewiesen sind und nicht ohne den jeweils anderen überleben können.

Dieser obligate Status schlägt sich auch in den Modifikationen nieder, durch welche sich beide Organismen im Verlauf der Evolution an die symbiontische Lebensweise angepasst haben. Für die Diatomee gehört hierzu die Kontrolle der Zellteilung der Endosymbionten ebenso wie die vertikale Weitergabe der Sphaeroidkörper an die nächste Generation. Durch die physiologische Anpassung an eine endosymbiontische Lebensweise konnten die Sphaeroidkörper im Verlauf der Coevolution solche Stoffwechselwege reduzieren, welche durch eine intrazelluläre Lokalisation und eine - zumindest teilweise – Versorgung durch die Wirtszelle nicht mehr nötig waren. Eine solche physiologische Reduktion geht mit genetischen Modifikationen einher, die durch die Mutation und Deletion von Genen gekennzeichnet sind, die für nicht mehr benötigte Proteine kodieren (Hoffmeister und Martin, 2003). Zahlreiche derartige Modifikationen auf genetischem Niveau konnten durch das Sequenzierprojekt identifiziert und analysiert werden (Kap. 3.10), und deuten ebenfalls auf einen obligaten Status der Symbiose hin (Kap. 4.5.3/4.5.4).

Eine wichtige Anpassung der Endosymbionten stellt das Fehlen von photosynthetischer Aktivität dar, dem ein Verlust von Genen wie *petE* auf dem Sphaeroidkörpergenom zugrunde liegt. Aufgrund der Deletion dieser Stoffwechselleistung sind die Endosymbionten von Energie bzw. Nährstoffen abhängig, welche von der Wirtszelle zur Verfügung gestellt werden. Sphaeroidkörper außerhalb der Wirtszelle sind, da sie essentielle Gene für Photosynthesefaktoren verloren haben, vermutlich nicht zur Synthese von ausreichend Energie für Wachstum und Vermehrung in der Lage. Des Weiteren müssten sich, um eine regulierbare und effiziente Versorgung der Endosymbionten durch die Wirtszelle zu gewährleisten, spezifische Transportmechanismen über die verschiedenen Sphaeroidkörpermembranen entwickelt haben (Winzer et al., 1999).

Die dargestellten Anpassungen der Diatomee sowie der Sphaeroidkörper kennzeichnen die Symbiose als permanent und obligat. Dieser Befund konnte auch durch die Ergebnisse aus der vergleichenden Genomanalyse bestätigt werden (Kap. 4.5). Damit unterscheidet sich diese Symbiose von allen anderen bisher beschriebenen Cyanobakterien-Assoziationen und stellt eventuell den Übergang zu einem neuen, stickstofffixierenden Organell dar. Diese Hypothese wird in Kap. 4.7 näher diskutiert.

4.5 Analyse des Sphaeroidkörper-Genoms

Sphaeroidkörper wurden als permanent-obligate Symbionten der Diatomee *R. gibba* charakterisiert. Als nächster freilebender Verwandter dieser Endosymbionten wurde das diazotrophe Cyanobakterium *Cyanothece* sp. 51142 (*Cyanothece*) identifiziert (Kap. 3.5.3).

Die Genome permanent-obligater Endosymbionten, welche vertikal zur nächsten Wirtsgeneration weitergegeben werden, weisen im Vergleich zu den DNA-Sequenzen ihrer freilebenden Verwandten verschiedene Veränderungen auf, welche auf die neue Lebensweise zurückzuführen sind (Klasson und Andersson, 2004; Stêpkowski und Legocki, 2001).

Um Informationen über das Genom der Sphaeroidkörper und eventuelle genomische Modifikationen zu erhalten, die mit der symbiontischen Assoziation einhergehen, wurde ein Sequenzierprojekt initiiert. In diesem Zusammenhang wurden sowohl von Sphaeroidkörpern als auch von *Cyanothece* die *nif*-Regionen sowie angrenzende Genom-Bereiche sequenziert. Die vergleichende Analyse der Sphaeroidkörper-Region mit dem korrespondierenden Bereich von *Cyanothece* sowie den Genomen anderer Cyanobakterien und Endosymbionten wurde genutzt, um genetische Veränderungen der Sphaeroidkörper zu identifizieren.

Diese Sequenzierung eines Sphaeroidkörper-DNA-Fragments lieferte damit erstmals einen Einblick in das Genom eines obligaten cyanobakteriellen Symbionten.

Innerhalb dieser Arbeit wurden 51475 bp des Sphaeroidkörper-Genoms und 63362 bp des *Cyanothece*-Genoms sequenziert (Kap. 3.8). Die Fragmente beider Genome wurden für die direkte vergleichende Analyse verwendet. Des Weiteren wurden die gewonnenen Daten mit den in der Literatur beschriebenen Genomen anderer Bakterien verglichen.

Durch die Analyse konnten zahlreiche Modifikationen des Sphaeroidkörper-Genoms aufgezeigt werden. Diese Veränderungen werden im Folgenden näher vorgestellt und diskutiert.

4.5.1 Sphaeroidkörper-Gene und Gendichte

Innerhalb des sequenzierten Genombereichs der Sphaeroidkörper konnten insgesamt 47 Gene und *orf*'s identifiziert werden. Hierzu gehören zahlreiche Gene für Faktoren der molekularen Stickstofffixierung, wie sie bei anderen Cyanobakterien beschrieben und auch in der *Cyanothece*-Sequenz identifiziert wurden (Kap. 3.9.3). Die Analyse der *nif*-Region ergab, dass bei *Cyanothece* und bei Sphaeroidkörpern die Größe und Anordnung der Gene weitgehend identisch ist. Im stickstofffixierenden Cyanobakterium *Synechococcus* sp. sind die *nif*-Gene in mehreren Operons organisiert (Huang et al., 1999). Eine solche Operonsstruktur ist auch für die *nif*-Region in Sphaeroidkörpern zu vermuten.

Innerhalb der *nif*-Region der Sphaeroidkörper wurden 29 Gene und *orf*'s identifiziert, welche homolog zu den *nif*-Genen und anderen *orf*'s von *Cyanothece* sind. Im Genombereich, welcher in Sphaeroidkörpern auf die *nif*-Region folgt, konnten dagegen keine Gene identifiziert werden, welche Homologien zu *orf*'s im korrespondierenden Genombereich von *Cyanothece* zeigen. Dieser Bereich wird in weiteren Beschreibungen als 3'-Bereich bezeichnet. In dieser Region liegen in den Sphaeroidkörpern Gene für Proteine unterschiedlicher Funktion wie beispielsweise Untereinheiten der NADH Dehydrogenase sowie Gene für Faktoren der Aminosäurebiosynthese (Kap. 3.9.2).

Bei weiterer Analyse der 3'-Region zeigte sich, dass vor allem in diesem Bereich die Anzahl großer A/T-reicher, nicht-kodierender (NC-) Regionen zunimmt. Diese Regionen könnten das Ergebnis von Mutationseignissen sein, durch die Gene im Verlauf der Evolution deletiert wurden. Eine nähere Diskussion dieser Sequenzbereiche folgt in Kap. 4.5.4.

Bei 47 kodierten *orf*'s und einer Sequenzlänge von ca. 51,5 kbp ergibt sich bei Sphaeroidkörpern eine Gendichte von 1 Gen pro 1095 bp. Damit werden in den Sphaeroidkörpern auf einem festgelegten DNA-Abschnitt weniger Gene kodiert als bei *Cyanothece* mit einer Gendichte von 1 Gen/960 bp. Der für die Sphaeroidkörper ermittelte Wert liegt dabei im Bereich von anderen freilebenden Cyanobakterien. So liegt die Gendichte im filamentösen, stickstofffixierenden Cyanobakterium *Anabaena nostoc* bei 1 Gen/1195 bp und bei *Gleobacter violaceus* bei 1 Gen/1051 bp (Kaneko et al., 2001; Nakamura et al., 2003). Selbst bei verschiedenen Stämmen eines Cyanobakteriums wie *Plectonococcus marinus* schwanken die Werte zwischen 930 bp und 1060 bp (Rocap et al., 2003; Dufresne et al., 2003).

Insgesamt wurden 29,5 % der analysierten Sphaeroidkörper-Sequenz als nicht-kodierend eingestuft, das heißt, es konnten keine offenen Leserahmen identifiziert werden. Dagegen machen in *Cyanothece* intergenische und nicht-kodierende Bereiche nur 19,5 % des analysierten Fragments aus. In anderen freilebenden Cyanobakterien liegen die Werte für die komplette Genomsequenz zwischen 18,2 % und 10,1 %. Der bei Sphaeroidkörpern ermittelte hohe Gehalt an nicht-kodierender DNA ergibt sich vor allem aus der großen Anzahl der NC-Regionen im 3'-Bereich des sequenzierten Genom-Fragments. Daraus resultiert in dieser Region eine Gendichte von nur 1 Gen pro 1253 bp im Vergleich zu 1 Gen pro 899 bp innerhalb der *nif*-Genregion.

Die Genome von permanenten Endosymbionten zeigen im Zuge vielseitiger Modifikationen eine Tendenz zu Genverlust bei gleichzeitiger Genomverkleinerung. So besitzen die intrazellulären Endosymbionten von Blattläusen – Proteobakterien des Genus *Buchnera* sp. – nur noch Genome zwischen 616 kbp und 641 kbp Größe, auf denen 504 bis 564 Gene kodiert sind (Shigenobu et al., 2000; van Ham et al., 2003; Tamas et al., 2002). Dennoch liegt der Anteil an nicht-kodierender DNA mit ca. 16 % deutlich unter dem für Sphaeroidkörper ermittelten Wert. Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass in anderen Symbionten mutierte Gene oder Genbereiche deletiert wurden, was zur Reduktion der Genomgröße und den rezenten kompakten und ökonomischen Genomen dieser Organismen führte. Es liegen keine Ergebnisse über die Gesamtgröße des Genoms von Sphaeroidkörpern vor. Eine Erklärung für den hohen Anteils an nicht-kodierender DNA wäre, dass in den Sphaeroidkörpern zwar bereits Gene, welche für die symbiontische Lebensweise nicht mehr essentiell waren, durch Mutationen inaktiviert sind, diese mutierten Regionen aber noch nicht durch Deletionsereignisse eliminiert wurden (siehe auch Kap. 4.6). In diesem Fall wäre für die Sphaeroidkörper noch keine drastische Reduktion der Genomgröße im Vergleich zu freilebenden Cyanobakterien zu erwarten.

4.5.2 A/T-Gehalt und Codon-Nutzung der Sphaeroidkörper

Der A/T-Gehalt des analysierten Fragments des Sphaeroidkörper-Genoms liegt bei 62,8 %. Wie der Nukleotid-Plot in Abb. 3-16 zeigt, ist die Verteilung der verschiedenen Nukleotide jedoch nicht über die gesamte Sequenz gleich. Innerhalb der Gene und *orf*'s – also in Proteinkodierenden Bereichen – liegt der Gehalt bei ca. 58 %, innerhalb der intergenischen Regionen steigt er auf annähernd 71 %. Die großen NC-Regionen können dabei Werte von bis zu 78 %

aufweisen. Die *nif*-Genregion hat mit 58,8 % im Vergleich zur restlichen Sequenz (3'-Region) mit 65,64 % einen niedrigeren und gleichmäßigeren A/T-Gehalt.

In *Cyanothece* sp. wurde für das analysierte Fragment ein A/T-Gehalt von 60,22 % für die komplette Sequenz sowie 59,35 % für die proteinkodierenden Bereiche ermittelt. Die *nif*-Region hat einen Gehalt von 57,34 %, der 3'-Bereich von 61,84 %.

In beiden untersuchten Abschnitten unterscheidet sich damit der A/T-Gehalt für das gesamte Genomfragment sowie für die kodierenden Bereiche nicht signifikant. Betrachtet man weitere freilebende Cyanobakterien, so können hier die A/T-Werte – berechnet aus der gesamten Genomsequenz – stark schwanken (Tab. 4-1). Obligate permanente Endosymbionten von Insekten wie *Buchnera* sp. weisen dagegen eine starke Tendenz zu A/T-reicheren Genomen auf. Dasselbe gilt für die Genome von permanenten endosymbiontischen Eukaryoten. So hat beispielsweise das sogenannte Nucleomorph, das Zellkernrelikt einer endosymbiontischen Rotalge der Cryptomonade *Guillardia theta*, einen A/T-Gehalt von 73,5 % (Douglas et al., 2001).

Spezies	A/T-Gehalt (%)
Sphaeroidkörper von <i>R. gibba</i>	62,8
<i>Cyanothece</i> sp. ATCC 51142	60,2
<i>Anabaena nostoc</i>	58,7
<i>Gleobacter violaceus</i>	38,0
<i>Prochlorococcus marinus</i> MED4	69,2
<i>Synechococcus</i> sp.	40,6
<i>Buchnera aphidicola</i> APS	73,7
<i>Blochmannia floridanus</i>	72,6
<i>Wigglesworthia glossinidia</i>	77,5

Tab. 4-1: A/T-Gehalt der bekannten Genomsequenzen verschiedener freilebender Cyanobakterien und permanenter bakterieller Endosymbionten

Die Ausbildung von A/T-reichen Genomen bei permanenten Endosymbionten hat mehrere Ursachen. So ist die Genom-Evolution in sexuell isolierten Populationen, beispielsweise vertikal übertragenen Endosymbionten, charakterisiert durch einen Verlust an Rekombinationsmöglichkeiten, erhöhte Mutationsraten und die Fixierung von deletierenden Mutationen durch sogenannten *random genetic drift* (Mira und Moran, 2002). Diese genetische Drift beschreibt die Zufallsveränderung von Genfrequenzen in kleinen Populationen. Solche Veränderungen werden auch durch *Muller's Ratchet* beschrieben, und

fürten im Verlauf der Evolution zu den reduzierten, A/T-reichen Genomen rezenter Endosymbionten (Muller, 1964). Eine derartige Tendenz zu kleinen A/T-reichen Genomen ist nicht nur bei Endosymbionten, sondern auch bei obligat intrazellulären Pathogenen wie *Rickettsia* sp. zu beobachten (Moran, 2002).

Die Anhäufung von bestimmten Nukleotiden wie Adenin und Thymin ist vermutlich auf einen Verlust bestimmter Reparatur-Gene und der damit verbundenen Anhäufung von Mutationen in den Genomen intrazellulärer, obligater Organismen zurückzuführen. Zahlreiche unterschiedliche Mutationen können zu einem Wechsel von G-C- zu A-T-Basenpaarungen führen. So kann beispielsweise die Desaminierung von Cytosin zu Uracil oder der Einbau von dATP gegenüber Apurinierungsstellen den genomischen G/C-Gehalt beeinflussen, wenn diese Mutationen nicht durch Reparaturmechanismen korrigiert werden.

Die Tendenz zur Anhäufung von Nukleotiden wie A und T ist nicht in allen genomischen Regionen gleich. So dürfen in proteinkodierenden Bereichen keine Substitutionen an Positionen vorkommen, an welchen es durch die Mutation zu einer Destabilisierung oder einem Funktionsverlust des reifen Proteins kommen kann. Innerhalb permanent intrazellulärer Bakterien mit A/T-reichen Genomen zeigen daher Proteine häufig eine Tendenz zur Anhäufung von Aminosäuren, welche durch A/T-reiche Codons kodiert werden. Hierzu zählt zum Beispiel Isoleucin Ile (AT[TCA]) und Lysin Lys (AA[AG]). Insgesamt findet man eine Tendenz zu A und T häufig an der dritten, der *wobble*-Position eines Codons. Hier haben Veränderungen durch Mutationen einen geringeren Effekt auf die Aminosäure und damit auf die Funktionalität des reifen Proteins.

In der analysierten Sphaeroidkörper-Sequenz zeigt sich eine typische Verteilung der Nukleotid-Häufigkeiten an den drei Positionen eines Codons. Die Häufigkeit für A oder T an der dritten Position ist gegenüber den ersten beiden Positionen erhöht. Verglichen mit *Cyanothece* konnte kein signifikanter Unterschied bzw. eine Tendenz zu A/T-reicheren Codons festgestellt werden, die Häufigkeiten bewegen sich innerhalb der Werte, wie sie auch für andere Cyanobakterien-Genome ermittelt wurden. Dagegen zeigen die verschiedenen Endosymbionten von Insekten eine deutliche Tendenz zu A/T-reicheren Codons, wie in Tabelle 4-2 wiedergegeben.

Spezies	A- oder T-Häufigkeit an Codonpositionen in %		
	1. Position	2. Position	3. Position
Sphaeroidkörper von <i>R. gibba</i>	48,16	61,89	67,25
<i>Cyanothece</i> sp. ATCC 51142	49,51	61,40	66,81
<i>Anabaena nostoc</i>	47,21	61,05	64,49
<i>Gleobacter violaceus</i>	34,10	54,26	23,05
<i>Prochlorococcus marinus</i> MED4	58,68	66,28	80,13
<i>Synechococcus</i>	34,23	54,37	30,75
<i>Buchnera aphidicola</i> APS	62,62	69,41	85,77
<i>Blochmannia floridanus</i>	61,33	68,08	83,95
<i>Wigglesworthia glossinidia</i>	69,05	71,82	88,15

Tab. 4-2: Häufigkeit von Adenin (A) odet Thymin (T) an den verschiedenen Codon-Positionen

Obwohl es sich bei Sphaeroidkörpern um obligate, intrazelluläre Symbionten handelt, unterscheidet sie sowohl der A/T-Gehalt als auch ihre Codon-Nutzung von den Genomen anderer bakterieller Endosymbionten. Dies könnte zum einen darauf zurückzuführen sein, dass nur ein kleiner Sequenzbereich der Sphaeroidkörper und nicht das komplette Genom für die Analyse verwendet werden konnte. Innerhalb des untersuchten Sphaeroidkörper-Genomfragments liegt die *nif*-Genregion, ein Bereich, welcher vermutlich einem höheren Selektionsdruck unterliegt als andere Regionen (Kap. 4.5.4). Betrachtet man dagegen die 3'-Region, so finden sich hier mit den zahlreichen NC-Regionen Bereiche, deren Kennzeichen stärker an die Genome anderer Endosymbionten erinnern. Innerhalb dieser Regionen zeigt der A/T-Gehalt ähnliche Tendenzen wie bei bakteriellen Endosymbionten von Insekten. Eine Erklärung wäre, dass im freilebenden Vorläufer der Sphaeroidkörper in diesen Regionen Gene vorlagen, die für die symbiontische Interaktion nicht essentiell waren. Durch genetische Drift bei gleichzeitig fehlender Selektion konnten sich daher im Verlauf der Evolution in diesen Bereichen Mutationen innerhalb der Sequenz fixieren (Ohta, 1972; Ohta, 1992). Ein Grund für die insgesamt geringe Anhäufung von Adenin und Thymin in der untersuchten Sequenz könnte darin zu finden sein, dass in den Sphaeroidkörpern Reparaturgene - wie für *recA* gezeigt - eventuell noch nicht inaktiv sind und daher auftretende Mutationen schneller und effektiver korrigiert werden können.

4.5.3 Mutation, Verkürzung und Deletion von Genen

Innerhalb des analysierten Fragments des Sphaeroidkörper-Genoms konnten durch Analyse verschiedener Gene und Regionen Merkmale festgestellt werden, in denen sich die Endosymbionten von ihren freilebenden Verwandten unterscheiden.

Hierzu gehört beispielsweise das *fdxN*-Gen, das in Sphaeroidkörpern nur noch als Pseudogen vorliegt und damit kein funktionelles Ferredoxin mehr kodiert. Der Bereich des *fdxN*-Pseudogens weist im Vergleich zu *Cyanothce-fdxN* zahlreiche Veränderungen auf, wie das Auftreten von Punktmutationen, welche die Aminosäuren betreffen sowie die Verschiebung des Leserahmens durch Insertionen oder Deletionen (Kap. 3.10.1).

Eine andere Situation findet man bei der Betrachtung des *nifU*-Gens der Sphaeroidkörper (Kap. 3.10.2). Der Leserahmen des Gens mit Start- und Stop-Codon ist intakt und kodiert zwar für ein Protein, dieses ist jedoch im Vergleich zu NifU anderer Cyanobakterien N-terminal stark verkürzt. Im 5'-flankierenden Bereich des *nifU*-Gens von Sphaeroidkörpern konnten keine Sequenzen identifiziert werden, welche auf den fehlenden Teil des cyanobakteriellen *nifU*-Gens hindeuten. Dies könnte damit zu erklären sein, dass Mutationen diesen Bereich so stark verändert haben, dass der fehlende Teil des Gens nicht mehr zu erkennen ist, oder dass der 5'-Bereich von *nifU* durch Rekombinationsereignisse – eventuell nach vielfacher Mutation – komplett deletiert ist.

Ein weiteres Merkmal des Sphaeroidkörper-Genoms ist die vollständige Deletion von Genen, welche von freilebenden Cyanobakterien kodiert werden. Hierzu gehört das bereits beschriebene Gen für Plastocyanin, welches eine zentrale Rolle in den lichtabhängigen Reaktionen der Photosynthese einnimmt (Kap. 3.10.4). Des Weiteren stellen die großen A/T-reichen NC-Cluster vermutlich ebenfalls Regionen dar, welche durch Mutation von Genen entstanden sind. Dies konnte durch die Analyse der *vap*-Region in *Cyanothece* und dem hierzu korrespondierenden Bereich in den Sphaeroidkörpern gezeigt werden (Kap. 3.10.3).

Trotz dieser zahlreichen Modifikationen scheinen in Sphaeroidkörpern nur bestimmte Gene und Regionen von Modifikationen betroffen zu sein. Wie bereits in Kap. 4.3 diskutiert, würde ein durch Mutation ausgelöster Verlust von Genen, welche für die Nitrogenase-Aktivität essentiell sind, vermutlich auch das Ende der symbiontischen Interaktion bedeuten. Daher liegt auf der *nif*-Genregion ein vergleichsweise höherer Selektionsdruck als auf der 3'-Region der analysierten Sequenz. Innerhalb der *nif*-Gene konnten Veränderungen nur an *fdxN* und an *nifU* festgestellt werden. Im filamentösen stickstofffixierenden Cyanobakterium *Anabaena variabilis* konnte gezeigt werden, dass hier sowohl *fdxN* als auch *nifU* nicht essentiell für

Nitrogenase-Aktivität und N₂-Fixierung sind (Masepohl, 1997; Lyons und Thiel, 1995). Dies lässt vermuten, dass sich im Verlauf der Evolution innerhalb der *nif*-Gene nur Mutationen bzw. Veränderungen anhäufen konnten, welche keinen Effekt auf die Nitrogenase-Aktivität der Sphaeroidkörper hatten. Gleichzeitig konnten Gene für solche Funktionen verloren gehen, welche für eine intrazelluläre symbiontische Lebensweise des ehemals freilebenden Cyanobakteriums nicht mehr essentiell waren. Hierzu gehörten beispielsweise Gene für Proteine mit Funktion in der Photosynthese wie *petE* für Plastocyanin.

Diese unterschiedliche Mutations bzw. Deletionsrate in essentiellen und nicht-essentiellen Bereichen lässt sich auch anhand des A/T-Gehalts der analysierten Sphaeroidkörper-Sequenz beobachten. Während die *nif*-Genregion einen weitgehend konservierten Charakter mit konstantem A/T-Gehalt aufweist, zeigt die 3'-Region starke Schwankungen im A/T-Gehalt, welche mit dem Auftreten der NC-Regionen gekoppelt sind.

4.5.4 A/T-reiche, nicht-kodierende Regionen im Sphaeroidkörper-Genom

Durch Analyse des sequenzierten Fragments des Sphaeroidkörpergenoms konnten genetische Merkmale festgestellt werden, in welchen sich die Endosymbionten von ihren freilebenden Verwandten unterscheiden. Hierzu gehört das Auftreten eines Pseudogens von *fdxN*, die Verkürzung von *nifU* sowie der Verlust von verschiedenen Genen bzw. *orf*'s. Es zeigt sich, dass die *nif*-Region der Sphaeroidkörper vergleichsweise konserviert vorliegt. Hier konnten, bis auf wenige Veränderungen nicht-essentieller Gene, keine Modifikationen in Bezug auf A/T-Zusammensetzung, Gendichte und Genabfolge im Vergleich zu *Cyanothece* festgestellt werden.

Auf den *nif*-Gencluster der Sphaeroidkörper und von *Cyanothece* folgt eine als 3'-Bereich bezeichnete Region, in der jeweils Gene unterschiedlicher Funktion kodiert werden. Weder in *Cyanothece* noch in Sphaeroidkörpern wurden in diesem Bereich Gene detektiert, welche mit der Stickstofffixierung assoziiert sind. In *Cyanothece* weist die 3'-Region Gene unterschiedlicher Funktionen auf, unterscheidet sich aber in Bezug auf die Gendichte nicht signifikant von der *nif*-Region. In den Sphaeroidkörpern zeigt die 3'-Region eine signifikant geringere Gendichte als die *nif*-Genregion sowie die 3'-Region von *Cyanothece*. Kodierende Bereiche werden hier mehrfach durch ungewöhnlich große, nicht-kodierende Sequenzbereiche unterbrochen, welche eine starke Tendenz zu A/T-Reichtum zeigen. Innerhalb der 3'-Region konnten 6 solcher NC-Regionen identifiziert werden (Kap. 3.9.3).

Bei diesen NC-Regionen handelt es sich vermutlich um Bereiche, in welchen durch Mutationsereignisse zuvor kodierte Gene oder *orf*'s eliminiert wurden. Diese mutierten Regionen weisen einen hohen Gehalt an Adenin und Thymin auf, welcher durch die zuvor beschriebene Anhäufung und Fixierung von Mutationen im Endosymbiontengenom entstanden sein könnten.

Die Beobachtung, dass auf die *nif*-Region keine derartigen deletierenden Prozesse eingewirkt haben, könnte darauf hindeuten, dass die dort kodierten Gene einem höheren Selektionsdruck unterliegen. Eine Mutation essentieller *nif*-Gene könnte zum Verlust der Nitrogenase-Aktivität der Sphaeroidkörper führen. Da die Fixierung von molekularem Stickstoff unter Umständen den unmittelbaren Nutzen der Symbiose für die Wirtszelle darstellt, wären durch eine solche Mutation die Endosymbionten im Verlauf der Evolution für die Diatomee hinfällig geworden und wieder verlorengegangen. Der höhere Selektionsdruck auf Gene zur Stickstofffixierung liefert daher weitere Hinweise darauf, dass diese Stoffwechselleistung der Sphaeroidkörper eine wichtige Rolle bei der symbiontischen Interaktion und Coevolution der beiden Symbiosepartner spielen könnte. Mutationen scheinen sich demnach nur in solchen Regionen angehäuft zu haben, in denen Gene kodiert wurden, die für die Funktion der Sphaeroidkörper als Endosymbionten und damit für eine Aufrechterhaltung der Symbiose nicht essentiell waren.

Welche Gene innerhalb der NC-Regionen im Verlauf der Evolution deletiert wurden, konnte durch vergleichende Sequenzanalyse zwischen Sphaeroidkörpern und *Cyanothece* nicht mehr eindeutig bestimmt werden. Zumindest die schon näher beschriebene und in Kap. 3.10.3 vorgestellte *vap*-Region in *Cyanothece* scheint bei Sphaeroidkörpern vollständig deletiert zu sein.

Der Erhalt der NC-Regionen deutet auch darauf hin, dass im Sphaeroidkörpergenom Bereiche mit hohen Mutationsraten noch nicht vollständig deletiert wurden, und somit die Gesamtgröße des Endosymbiontengenoms noch keine starke Reduktion erfahren hat. Hier müssen weitere Sequenzdaten zeigen, ob ein Auftreten solcher Regionen auch in anderen Genombereichen zu beobachten ist. Des Weiteren sollte die Bestimmung der Gesamtgenomgröße zusätzliche Hinweise auf eine deletierende genetische Evolution der Sphaeroidkörper liefern.

4.6 Genetische Modifikation der Sphaeroidkörper im Vergleich zu anderen intrazellulären Bakterien

Veränderungen auf genomischem Niveau sind ein Kennzeichen der Evolution obligat intrazellulärer Bakterien. Dies trifft sowohl auf bakterielle eukaryote Endosymbionten als auch auf verschiedene intrazelluläre Pathogene zu.

Auch die Symbiose zwischen *R. gibba* und Sphaeroidkörpern führte zu physiologischen und morphologischen Modifikationen der Endosymbionten, welche sich auch in Veränderungen auf genomischen Niveau niederschlagen. So konnte in der analysierten Sequenz der Sphaeroidkörper die Mutation von Genen zu Pseudogenen, die Verkürzung von Genen, Genverlust und das Auftreten großer A/T-reicher NC-Regionen beobachtet werden. Derartige Mutationen bzw. Deletionen von Genen führen häufig zum Verlust solcher Stoffwechselleistungen, die für eine endosymbiontische Lebensweise nicht mehr nötig sind oder welche durch die Aufrechterhaltung der Symbiose kompensiert werden können (Moran und Wernegreen, 2000; Ochman und Moran, 2001). Gleichzeitig besteht eine Selektion für den Erhalt solcher Stoffwechselleistungen, die zum Nutzen des Wirts sind und der Aufrechterhaltung der Symbiose dienen (Tamas et al., 2001).

Die verschiedenen genetischen Modifikationen wurden bisher vor allem in bakteriellen Endosymbionten von Insekten eingehend studiert. Hier zeigt sich eine massive Reduktion der Genomgröße in Verbindung mit der Deletion zahlreicher nicht-essentieller Gene, sowie eine starke Tendenz zur Akkumulation von Adenin und Thymin. Diese Prozesse sind vor allem durch die Anhäufung und Fixierung von Mutationen durch *random genetic drift* in den kleinen, isolierten *bottleneck*-Populationen der Endosymbionten zu erklären. Für bakterielle Endosymbionten wird vermutet, dass es nach dem Übergang zur symbiontischen Lebensweise mit vertikaler Übertragung zunächst zu einer starken Anhäufung von Pseudogenen sowie Inaktivierung von Genen durch Mutation im gesamten Genom kam, welche mit der Deletion großer Fragmente einherging. Mutationen, bei denen Basen wie A und T favorisiert auftraten, führten zum hohen A/T-Gehalt der verbliebenen DNA. Danach gingen, durch kleinere Deletionseignisse, Pseudogene und intergenische Regionen verloren. In Verbindung mit diesen Prozessen konnte es zum Verlust bestimmter DNA-Reparaturmechanismen kommen, wodurch die Häufigkeit von fixierten Mutationen ansteigen konnte.

Die unterschiedlichen Stadien der Genomevolution lassen sich zum Teil in rezenten Organismen beobachten. So ist das Genom von *Mycobacterium leprea*, einem obligat-intrazellulärem Pathogenen, bei einer Größe von ca. 3 Mb charakterisiert durch zahlreiche

Pseudogene, was ein frühes Stadium der Genom-Reduktion vermuten lässt (Cole et al., 2001). Dagegen weist das Genom von *Rickettsia prowazekii* – ebenfalls ein pathogenes Bakterium – nur eine Größe von ca. 1 Mb und wenige Pseudogene auf (Andersson und Andersson, 2001). Diese kleinen Genome mit hoher Gendichte und nur wenigen Pseudogenen, welche auch in Endosymbionten von Insekten wie *Buchnera* sp. beschrieben wurden, würden spätere Stadien dieses Evolutions-Prozesses repräsentieren (Mira et al., 2001). In diesen Genomen, wie bei *Buchnera aphidicola*, fehlen auch zahlreiche Gene für Proteine wie RecA und RecF, welche bei DNA-Reparaturmechanismen eine Rolle spielen (Tamas et al., 2002).

Die genomischen Veränderungen der Sphaeroidkörper deuten darauf hin, dass sich diese Endosymbionten in einem frühen Stadium der genomischen Reduktion befinden. Es konnten degenerative Prozesse wie Mutation und Inaktivierung von Genen beobachtet werden, diese gehen jedoch nicht mit größeren Deletionen einher. So finden sich beispielsweise in der 3'-Region der analysierten Sequenz zahlreiche nicht-kodierende Regionen, welche untypisch für die Genome anderer permanenter Endosymbionten sind. In Bezug auf die analysierte Sequenz konnte, mit Ausnahme innerhalb intergenischer Bereiche und der NC-Regionen, keine Tendenz zu höherem A/T-Gehalt festgestellt werden. Die Analyse von Sphaeroidkörper-RecA als Faktor der DNA-Reparatur ergab, dass dieses Gen nicht deletiert wurde und im Bereich der untersuchten Sequenz nicht mutiert vorliegt (Kap. 3.11).

Die Sphaeroidkörper könnten somit ein Stadium der Genom-Reduktion darstellen, welches zwischen der Ausbildung von Pseudogenen bzw. der Mutation von Genen und der massiven Deletion großer DNA-Fragmente liegt. Dies würde auch auf ein geringeres Alter der symbiontischen Interaktion hindeuten, als dies bei den Endosymbionten von Insekten der Fall ist. Die Besiedlung des Insekten-Wirts durch *Buchnera aphidicola* hat vermutlich vor 150-250 Millionen Jahren stattgefunden (Munson et al., 1991; Baumann et al., 1995). Am Grad der Genomveränderung gemessen, müsste die Sphaeroidkörper-*Rhopalodia*-Symbiose daher wesentlich jünger sein.

Informationen über die Gesamtgröße des Sphaeroidkörpergenoms müssen zeigen, ob an anderer Stelle bereits größere Deletionen stattgefunden haben, welche auf ein späteres Stadium der Symbiose und eine entwicklungsgeschichtlich frühere Besiedlung von *Rhopalodia* hindeuten könnten.

4.7 Sphaeroidkörper: eine Vorstufe zu stickstofffixierenden Organellen?

Ein semi-autonomes Organell kann definiert werden als intrazelluläres Derivat eines symbiontischen Bakteriums, bei welchem ein Transfer von mindestens einem Gen vom Symbionten zum Wirtsgenom stattgefunden hat, dessen Produkt gezielt zum Endosymbionten zurücktransportiert wird (Douglas und Raven, 2002). Diese Situation stellt sich in rezenten Organismen nur bei Plastiden und Mitochondrien dar. Weder bei den schon stark reduzierten verschiedenen Endosymbionten von Insekten noch in anderen endosymbiontischen Interaktionen konnte bisher ein solcher Gentransfer nachgewiesen werden (Andersson, 2000; Wernegreen, 2002; Hoffmeister und Martin, 2003).

In der Sphaeroidkörper-*Rhopalodia*-Symbiose konnte kein Transfer von Genen auf den Nucleus der Diatomee nachgewiesen werden. Die verschiedenen genetischen Veränderungen, die innerhalb der analysierten Sphaeroidkörper-Sequenz identifiziert wurden, deuten darauf hin, dass sich die symbiontische Assoziation in einem frühen Stadium der genomischen Evolution befindet. Dennoch zeigt die physiologische Interaktion der beiden Organismen bereits Kennzeichen eines fortgeschrittenen Symbiosestadiums. Hierzu gehören die vertikale Übertragung der Sphaeroidkörper, die Kontrolle der Zellteilung sowie eine Regulierung bestimmter Stoffwechselwege. Diese Merkmale zeichnen auch die Evolution der semi-autonomen Organellen aus.

Der Prozess eines erfolgreichen Gentransfers vom Endosymbionten zum Wirt ist in der untersuchten Interaktion theoretisch möglich. Alle *R. gibba*-Zellen enthalten Sphaeroidkörper, welche direkt an die Tochterzellen weitergegeben werden. Dies unterscheidet diese Assoziation von bakteriellen Symbiosen mit Insekten, bei denen Endosymbionten nur in speziellen Organen vorliegen und durch Infektion von Eiern oder Larven die nächste Generation erreichen. Eine Etablierung von symbiontischen Genen auf dem Nucleus von Wirtszellen ist hier nicht wahrscheinlich, da die Symbionten in somatischen Zellen vorliegen, deren Erbinformation nicht an die nächste Generation weitergegeben wird. Ein erfolgreicher Gentransfer würde sich demnach nicht in der Population fixieren. In der Sphaeroidkörper-Assoziation dagegen erhalten die Tochterzellen sowohl die Endosymbionten als auch das Erbmaterial der Wirtszelle, wodurch sich ein Gentransfer in einer Population etablieren könnte. Des Weiteren könnten Sphaeroidkörper – wie bei freilebenden Cyanobakterien beschrieben – mehrere Kopien ihres Genoms enthalten (Herdman et al., 1979). Der Transfer eines bestimmten Gens würde demnach nicht alle Genkopien innerhalb des Genoms betreffen,

wodurch Stoffwechselfunktionen bis zu einer Etablierung des Transfers aufrechterhalten werden könnten. Nach einem erfolgreichen Gentransfer müsste hier aber auch der gezielte Rücktransport des Genprodukts zurück zu den Sphaeroidkörpern gewährleistet sein. Hierzu wären topogene Signale notwendig, welche das Protein zu den Endosymbionten dirigieren. Die Entwicklung eines solchen Transportmechanismus innerhalb einer Zelle, welche schon zwei Typen von Organellen – eine komplexe Plastide sowie Mitochondrien – mit gerichteten Transportmechanismen enthält, setzt ein hohes Maß an Selektion voraus.

Ob eine derartige Evolution der Symbiose zwischen Sphaeroidkörpern und *R. gibba* stattgefunden hat, müssen daher weitere Untersuchungen zeigen.

4.8 Ausblick

Die Sphaeroidkörper der Diatomee *R. gibba* konnten als obligate Endosymbionten cyanobakterieller Herkunft charakterisiert werden, die innerhalb der Wirtszelle molekularen Stickstoff fixieren. Durch Analyse eines Genomfragments der Endosymbionten konnten genomische Modifikationen identifiziert werden, die eine reduktive genetische Evolution der Sphaeroidkörper zeigen.

Weitere Untersuchungen müssen belegen, ob und in welcher Form der von den Sphaeroidkörpern fixierte Stickstoff den Wirtszellen zur Verfügung gestellt wird, und wie die Endosymbionten mit der nötigen Energie versorgt werden. Des Weiteren sollten genomische Analysen Aufschluss über die Gesamtgröße des Sphaeroidkörpergenoms geben und einen Vergleich mit anderen Cyanobakterien und Endosymbionten erlauben. Zusätzliche Sequenzinformationen werden zeigen, in welchem Maß sich Merkmale von Mutationen und Deletionen finden, und ob das Ausmaß dieser Merkmale mit Regionen korreliert, welche für bestimmte Stoffwechselleistungen kodieren. Analysen des Sphaeroidkörper-Genoms könnten auch Hinweise liefern, ob bereits ein Transfer von genetischem Material in den Wirtsnucleus stattgefunden hat.

Mit der Sphaeroidkörper-*Rhopalodia*-Interaktion wurde erstmals eine obligate und intrazelluläre Symbiose zur Stickstofffixierung zwischen einem Cyanobakterium und einer eukaryoten Zelle beschrieben. Weitere Untersuchungen dieser Interaktion könnten daher nicht nur Informationen über die Evolution von Endosymbiosen liefern, sondern würden auch Einblicke in einen Prozess geben, der die Etablierung von molekularer Stickstofffixierung in höheren Organismen beschreibt.

5 Zusammenfassung

Die Diatomee *Rhopalodia gibba* enthält - neben den typischen Organellen von Heterokontophyten, Mitochondrien und einer komplexen Plastide – ungewöhnliche Einschlüsse, welche als Sphaeroidkörper bezeichnet werden. Morphologische Untersuchungen führten zur Vermutung, dass es sich bei diesen Sphaeroidkörpern um Endosymbionten bakterieller Herkunft handeln könnte. Des Weiteren wurde ein Zusammenhang zwischen den Einschlusskörpern und der bei *R. gibba* beobachteten Fähigkeit zur Fixierung von molekularem Stickstoff diskutiert.

Im Rahmen dieser Arbeit sollten die Sphaeroidkörper von *R. gibba* näher charakterisiert und ihre Funktion innerhalb der Diatomee aufgeklärt werden.

Hierzu wurden intakte Sphaeroidkörper aus Diatomeenzellen isoliert und aufgereinigt. Aus diesen Fraktionen konnte DNA präpariert und mittels molekularbiologischer sowie histologischer Analysen den Sphaeroidkörpern zugeordnet werden. Die Identifizierung eines Sphaeroidkörper-Genoms konnte damit die organismische Herkunft der Einschlusskörper und deren endosymbiontische Natur bestätigen. Durch phylogenetische Untersuchungen von Sphaeroidkörper-spezifischen Genen wurde das einzellige, diazotrophe Cyanobakterium *Cyanothece* sp. ATCC 51142 als nächster freilebender Verwandter der Sphaeroidkörper bestimmt.

Durch molekularbiologische Analysen im Rahmen eines Genom-Sequenzierprojekts wurde gezeigt, dass die cyanobakteriellen Endosymbionten von *R. gibba* alle Strukturgene der Nitrogenase sowie andere Gene für Faktoren der molekularen Stickstofffixierung kodieren. Die Nitrogenase konnte des Weiteren auf Proteinebene durch *in-situ* Lokalisation an Diatomeenzellen innerhalb der Sphaeroidkörper nachgewiesen werden.

Ein Sequenzierprojekt vergleichbarer Sequenzen sowohl der Sphaeroidkörper-DNA als auch von *Cyanothece* sp. diente dazu, genetische Modifikationen der Endosymbionten zu identifizieren. In diesem Zusammenhang wurden von beiden Organismen über 50 kbp des Genoms sequenziert und analysiert. Die Untersuchungen ergaben, dass das Sphaeroidkörper-Genom zahlreiche Modifikationen aufweist, welche mit der endosymbiontischen Lebensweise einhergehen. Hierzu gehörte vor allem eine reduzierende Evolution des Genoms, die sich durch Mutation, Modifikation sowie Deletion von Genen sowie der Ausbildung großer, nicht-kodierender A/T-reicher DNA-Regionen (NC-Regionen) auszeichnet. Derartige genomische Modifikationen ließen sich zum Teil auf physiologische Veränderungen der endosymbiontischen Bakterien übertragen. Diese Veränderungen – wie der Verlust der

photosynthetischen Aktivität – resultieren unter anderem in einer obligaten Abhängigkeit der Endosymbionten von der Wirtszelle. Die Analysen zeigten weiterhin, dass nicht alle Regionen des Sphaeroidkörper-Genoms gleich stark von genetischen Degenerationsprozessen betroffen sind und das Ausmaß der Veränderungen auf ein frühes Stadium der obligat-symbiontischen Interaktion hindeutet.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte damit gezeigt werden, dass es sich bei den Sphaeroidkörpern von *R. gibba* um obligate Endosymbionten cyanobakterieller Herkunft handelt, welche innerhalb der Wirtszelle molekularen Stickstoff fixieren. Damit wäre die Sphaeroidkörper-*Rhopalodia*-Assoziation die erste beschriebene obligate Symbiose zur Stickstofffixierung zwischen einem Bakterium und einem eukaryoten Organismus überhaupt.

Die Analyse des Sphaeroidkörper-Genoms sowie die identifizierten genetischen Modifikationen geben einen Einblick in die Genomevolution bakterieller intrazellulärer Symbionten. Dabei konnten mit den NC-Regionen Sequenzbereiche beschrieben werden, welche Hinweise auf genomische Veränderungen in den frühen Stadien symbiontischer Interaktion geben könnten. Die Sphaeroidkörper könnten somit sowohl als Modell für die Evolution bakterieller Endosymbionten als auch für die Etablierung Nitrogenase-abhängiger Stickstofffixierung in eukaryoten Zellen dienen.

6 Literatur

Adams DG: **Heterocyst formation in cyanobacteria.** *Curr. Opin. Microbiol.* 2000, **3**: 618-624

Allen JF: **Separate sexes and the mitochondrial theory of ageing.** *J Theor Biol.* 1996, **180**: 135-140

Allen JF, Raven JA: **Free-radical-induced mutation vs redox regulation: costs and benefits of genes in organelles.** *J mol Evol.* 1996, **42**: 482-492

Andersson JO: **Evolutionary genomics: Is *Buchnera* a bacterium or an organelle?** *Curr Biol.* 2000, **10**: 866-868

Andersson JO, Andersson SG: **Pseudogenes, junk DNA, and the dynamics of *Rickettsia* genomes.** *Mol Biol Evol.* 2001, **18**: 829-839

Andersson SG, Zomorodipour A, Andersson JO, Sicheritz-Ponten T, Alsmark UC, Podowski RM, Naslund AK, Eriksson AS, Winkler HH, Kurland CG: **The genome sequence of *Rickettsia prowazekii* and the origin of mitochondria.** *Nature.* 1998, **396**: 133-140

Attardi G: **Animal mitochondrial DNA: an extreme example of genetic economy.** *Int Rev Cytol.* 1985, **93**: 93-145

Baumann P, Baumann L, Lai CY, Rouhbakhsh D, Moran NA, Clark MA: **Genetics, physiology, and evolutionary relationships of the genus *Buchnera*: intracellular symbionts of aphids.** *Annu Rev Microbiol.* 1995, **49**: 55-94

Bergman B, Johansson C, Soderback E: **The *Nostoc-Gunnera* symbiosis.** *New Phytol.* 1992, **122**: 379-400

Bergman B, Gallon JR, Rai AN, Stal LJ: **N₂ Fixation by non-heterocystous cyanobacteria.** *FEMS Microbiol. Rev.* 1997, **19**: 139-185

Berman-Frank I, Lundgren P, Falkowski P: **Nitrogen fixation and photosynthetic oxygen evolution in cyanobacteria.** *Res Microbiol.* 2003, **154**: 157-164

Berman-Frank I, Lundgren P, Chen YB, Kupper H, Kolber Z, Bergman B, Falkowski P: **Segregation of nitrogen fixation and oxygenic photosynthesis in the marine cyanobacterium *Trichodesmium*.** *Science.* 2001, **294**: 1534-1537

Bhattacharya D, Medlin L: **The phylogeny of plastids: a review based on comparisons of small-subunit ribosomal RNA coding regions.** *J. Phycol.* 1995, **31**: 489-498

Birnboim HC, Doly J: **A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA.** *Nucleic Acids Res.* 1979, **7**: 1513-1523

Bishop PE, Premakumar R: **Alternative nitrogen fixation systems.** Stacey G, Burris RH, Evans DJ (ed.), *Biological nitrogen fixation.* Chapman & Hall, New York 1992: 736-762

Bohme H: **Regulation of nitrogen fixation in heterocyst-forming cyanobacteria.** *Trends Plant Sci.* 1998, **3**: 346-351

Bradford MM: **A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.** *Anal Biochem.* 1976 , **72**: 248-254

Bulmer M: **Coevolution of codon usage and transfer RNA abundance.** *Nature.* 1987, **325**: 728-730

Carpenter AJ, Janson S: **Intracellular cyanobacterial symbionts in the marine diatom *Climacodium frauenfeldianum* (Bacillariophyceae).** *J. Phycol.* 2000, **36**: 540-544

Cole ST, Eiglmeier K, Parkhill J, James KD, Thomson NR, Wheeler PR, Honore N, Garnier T, Churcher C, Harris D, Mungall K, Basham D, Brown D, Chillingworth T, Connor R, Davies RM, Devlin K, Duthoy S, Feltwell T, Fraser A, Hamlin N, Holroyd S, Hornsby T, Jagels K, Lacroix C, Maclean J, Moule S, Murphy L, Oliver K, Quail MA, Rajandream MA, Rutherford KM, Rutter S, Seeger K, Simon S, Simmonds M, Skelton J, Squares R, Squares S, Stevens K, Taylor K, Whitehead S, Woodward JR, Barrell BG: **Massive gene decay in the leprosy bacillus.** *Nature.* 2001, **409**: 1007-1011

Colón-López MS, Sherman DM, Sherman LA: **Transcriptional and Translational Regulation of Nitrogenase in Light-Dark- and Continuous-Light-Grown Cultures of the Unicellular Cyanobacterium *Cyanothece* sp. Strain ATCC 51142.** *J Bacteriol.* 1997, **179**: 4319-4327

Dean RD, Bolin JT, Zheng L: **Nitrogenase Metalloclusters: Structures, Organisation and Synthesis.** *J Bacteriol.* 1993, **175**: 6737-6744

de Bary HA: **51. Versammlung Deutscher Naturforscher und Ärzte, Kassel 1878**

Delwiche, CF, Palmer, JD: **The origin of plastids and their spread via secondary endosymbiosis.** In: Bhattacharya D (ed.): *Origins of algae and their plastids.* Vienna, New York: Springer Verlag 1997: 53-86

DeYoe HR, Marks JC, Lowe RL: **The effect of nitrogen and phosphorus on the endosymbiont load of *Rhopalodia gibba* and *Epithemia turgida* (Bacillariophyceae).** *J. Phycology.* 1992, **28**: 773-777

Douglas AE, Raven JA: **Genomes at the interface between bacteria and organelles.** *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2003, **358**: 5-17

Douglas S, Zauner S, Fraunholz M, Beaton M, Penny S, Deng LT, Wu X, Reith M, Cavalier-Smith T, Maier UG: **The highly reduced genome of an enslaved algal nucleus.** *Nature.* 2001, **410**: 1091-1096

Drum RW, Pankratz S: **Fine Structure of an Unusual Cytoplasmatic Inclusion in the Diatom Genus, *Rhopalodia*.** *Protoplasma.* 1965, **60**: 141-149

- Dufresne A, Salanoubat M, Partensky F, Artiguenave F, Axmann IM, Barbe V, Duprat S, Galperin MY, Koonin EV, Le Gall F, Makarova KS, Ostrowski M, Oztas S, Robert C, Rogozin IB, Scanlan DJ, Tandeau de Marsac N, Weissenbach J, Wincker P, Wolf YI, Hess WR: **Genome sequence of the cyanobacterium *Prochlorococcus marinus* SS120, a nearly minimal oxyphototrophic genome.** *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003, **100**: 10020-10025
- Endelin CS, Meeks JC: **Pure culture and reconstitution of the *Anthoceros-Nostoc* symbiotic association.** *Planta.* 1983, **158**: 157-165
- Falkowski PG, Raven JA: **Aquatic Photosynthesis.** *Blackwell Scientific, Oxford* 1997: 375
- Field CB, Behrenfeld MJ, Randerson JT, Falkowski P: **Primary production of the biosphere: integrating terrestrial and oceanic components.** *Science.* 1998, **281**: 237-240
- Floener L, Bothe H: **Nitrogen fixation in *Rhopalodia gibba*, a diatom containing blue-greenish inclusions symbiotically.** In Schwemmler W, Schenk HEA., Endocytobiology: Endosymbiosis and Cell Biology, a Synthesis of Recent Research, Vol. 1. *Walter de Gruyter & Co., Berlin* 1980: 541-552
- Geitler, L: **Zur Entwicklungsgeschichte der Epithemiaceen Epithemia, Rhopalodia und Denticula (Diatomophyceae) und ihre vermutlich symbiontischen Sphäroidkörper.** *Plant Syst. Evol.* 1977, **128**: 295-275
- Georgiadis MM, Komiya H, Chakrabarti P, Woo D, Kornuc JJ, Rees DC: **Crystallographic structure of the nitrogenase iron protein from *Azotobacter vinelandii*.** *Science.* 1992, **257**: 1653-1659
- Gibbs SP: **The route of entry of cytoplasmatically synthesized proteins into chloroplasts of algae possessing chloroplast ER.** *J. Cell Sci.* 1979, **35**: 253-266
- Gray MW: **Evolution of organellar genomes.** *Curr Opin Genet Dev.* 1999, **9**: 678-687
- Hageman RV, Burris RH: **Dinitrogenase and nitrogenase reductase associate and dissociate with each catalytic cycle.** *Proc Natl Acad Sci USA.* 1978, **75**: 2699-2702
- Hellriegel H, Wilfarth H: **Untersuchungen über die Stickstoffnahrung der Gramineen und Leguminosen.** *Beilageheft zu der Ztschr. Ver. Rübenzucker-Industrie Deutschen Reichs* 1888
- Herdman M, Janvier M, Rippka R, Stanier RY: **Genome size of cyanobacteria.** *J. Gen. Microbiol.* 1979, **111**: 73-85
- Hill DJ: **The pattern of development of *Anabeana* in the *Azolla-Anabeana* symbiosis.** *Planta.* 1975, **122**: 179-184
- Hill DR, Belbin TJ, Thorsteinsson MV, Bassam D, Brass S, Ernst A, Boger P, Paerl H, Mulligan ME, Potts M: **GlbN (cyanoglobin) is a peripheral membrane protein that is restricted to certain *Nostoc* spp.** *J Bacteriol.* 1996, **178**: 6587-6598
- Hoffmeister M, Martin W: **Interspecific evolution: microbial symbiosis, endosymbiosis and gene transfer.** *Environ Microbiol.* 2003, **5**: 641-649

- Huang TC, Lin RF, Chu MK, Chen HM: **Organization and expression of nitrogen-fixation genes in the aerobic nitrogen-fixing unicellular cyanobacterium *Synechococcus* sp. strain RF-1.** *Microbiology*. 1999, **145**: 743-753
- Janson S, Wouters J, Bergman B and Carpenter EJ: **Host specificity in the *Richelia*-diatom symbiosis revealed by *hetR* gene sequence analysis.** *Environ. Microbiol.* 1999, **1**: 431-438
- Jeanmougin F, Thompson J D, Gouy M, Higgins D G, Gibson T J: **Multiple sequence alignment with Clustal X.** *Trends Biochem. Sci.* 1998, **23**: 403-405
- Kaneko T, Nakamura Y, Wolk CP, Kuritz T, Sasamoto S, Watanabe A, Iriguchi M, Ishikawa A, Kawashima K, Kimura T, Kishida Y, Kohara M, Matsumoto M, Matsuno A, Muraki A, Nakazaki N, Shimpo S, Sugimoto M, Takazawa M, Yamada M, Yasuda M, Tabata S: **Complete genomic sequence of the filamentous nitrogen-fixing cyanobacterium *Anabaena* sp. strain PCC 7120.** *DNA Res.* 2001, **8**: 205-213
- Kaneko T, Sato S, Kotani H, Tanaka A, Asamizu E, Nakamura Y, Miyajima N, Hirosawa M, Sugiura M, Sasamoto S, Kimura T, Hosouchi T, Matsuno A, Muraki A, Nakazaki N, Naruo K, Okumura S, Shimpo S, Takeuchi C, Wada T, Watanabe A, Yamada M, Yasuda M, Tabata S: **Sequence analysis of the genome of the unicellular cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC6803. II. Sequence determination of the entire genome and assignment of potential protein-coding regions.** *DNA Res.* 1996, **3**: 109-136
- Kaplan D, Peters GA: **Interaction of carbon metabolism in the *Azolla-Anabaena* symbiosis.** *Symbiosis*. 1988, **6**: 53-68
- Kidd KK, Sgaramella-Zonta LA: **Phylogenetic analysis: concepts and methods.** *Am J Hum Genet.* 1971, **23**: 235-252
- Kim J, Rees DC: **Structural models for the metal centers in the nitrogenase molybdenum-iron protein.** *Science*. 1992, **257**: 1677-1682
- Klasson L, Andersson SG: **Evolution of minimal-gene-sets in host-dependent bacteria.** *Trends Microbiol.* 2004, **12**: 37-43
- Kneip C: **Analyse von Nucleomorph-kodiertem GidA der Cryptomonade *Guillardia theta* und Untersuchungen an Sphaeroidkörpern der Diatomee *Rhopalodia gibba*.** *Diplomarbeit, Philipps-Universität Marburg* 2002
- Kondo T, Mori T, Lebedeva NV, Aoki S, Ishiura M, Golden SS: **Circadian rhythms in rapidly dividing cyanobacteria.** *Science*. 1997, **275**: 224-227
- Ludwig W, Schleifer KH: **Bacterial phylogeny based on 16S and 23S rRNA sequence analysis.** *FEMS Microbiol Rev.* 1994, **15**: 155-173
- Lyons EM, Thiel T: **Characterization of *nifB*, *nifS*, and *nifU* genes in the cyanobacterium *Anabaena variabilis*: NifB is required for the vanadium-dependent nitrogenase.** *J Bacteriol.* 1995, **177**: 1570-1575

Maier UG, Fraunholz M, Zauner S, Penny S, and Douglas S: **A nucleomorph-encoded CbbX and the phylogeny of RuBisCo regulators.** *Mol Biol Evol.* 2000, **17**: 576-583

Margulis, L: **Origin of eukaryotic cells.** *New Haven: Yale University Press* 1970, **349**

Martin W, Muller M: **The hydrogen hypothesis for the first eukaryote.** *Nature.* 1998, **392**: 37-41

Martin W, Rotte C, Hoffmeister M, Theissen U, Gelius-Dietrich G, Ahr S, Henze K: **Early cell evolution, eukaryotes, anoxia, sulfide, oxygen, fungi first (?), and a tree of genomes revisited.** *IUBMB Life.* 2003, **55**:193-204

Martin W, Hermann RG: **Gene Transfer from Organelles to the Nucleus: How Much, What Happens, and Why.** *Plant Physiology.* 1998, **118**: 9-17

Masepohl B, Görlitz K, Monnerjahn U, Mosler B, Böhme H: **The ferredoxin-encoding *fdxN*-Gene of the filamentous cyanobacterium *Anabaena variabilis* ATCC 29413 is not essential for nitrogen fixation.** *New Phytol.* 1997, **136**: 419-423

McFadden GI: ***In situ* Hybridization Techniques: Molecular Cytology Goes Ultrastructural. Electron Microscopy of Plant Cells.** Hall JL, Hawes CR, *Academic Press, London* 1991: 219-255

Mira A, Moran NA: **Estimating population size and transmission bottlenecks in maternally transmitted endosymbiotic bacteria.** *Microb Ecol.* 2002, **44**: 137-143

Mira A, Ochman H, Moran NA: **Deletional bias and the evolution of bacterial genomes.** *Trends Genet.* 2001, **17**: 589-596

Meeks JC: **Cyanobacterial-bryophyte associations.** In Rai AN (ed.), *Handbook of symbiotic cyanobacteria.* *CRC Press, Inc., Boca Raton, Fla.* 1990: 43-63

Meeks JC, Elhai J: **Regulation of cellular differentiation in filamentous cyanobacteria in free-living and plant-associated symbiotic growth states.** *Microbiol Mol Biol Rev.* 2002, **66**: 94-121

Mereschkowsky VC: **Über Natur und Ursprung der Chromatophoren im Pflanzenreiche.** *Biologisches Centralblatt.* 1905, **25**: 593-604

Moran NA, Wernegreen JJ: **Lifestyle evolution in symbiotic bacteria: insights from genomics.** *Trends Ecol. Evol.* 2000, **15**: 321-326

Mulligan ME, Haselkorn R: **Nitrogen fixation (*nif*) genes of the cyanobacterium *Anabaena* species strain PCC 7120. The *nifB*-*fdxN*-*nifS*-*nifU* operon.** *J Biol Chem.* 1989 **264**: 19200-19207

Munson MA, Baumann P, Clark MA, Baumann L, Moran NA, Voegtlin DJ, Campbell BC: **Evidence for the establishment of aphid-eubacterium endosymbiosis in an ancestor of four aphid families.** *J Bacteriol.* 1991, **173**: 6321-6324

- Murray MG, Thompson WF: **Rapid isolation of high molecular weight plant DNA.** *Nucleic Acids Res.* 1980, **8**: 4321-4325
- Murry M, Wolk CP: **Evidence that the barrier to the penetration of oxygen into heterocysts depends upon two layers of the cell envelope.** *Arch Microbiol.* 1989, **151**: 469-474
- Nakamura Y, Kaneko T, Sato S, Mimuro M, Miyashita H, Tsuchiya T, Sasamoto S, Watanabe A, Kawashima K, Kishida Y, Kiyokawa C, Kohara M, Matsumoto M, Matsuno A, Nakazaki N, Shimpo S, Takeuchi C, Yamada M, Tabata S: **Complete genome structure of *Gloeobacter violaceus* PCC 7421, a cyanobacterium that lacks thylakoids.** *DNA Res.* 2003, **10**: 137-145
- Nicholas KB, Nicholas HB Jr, Deerfield DW II: **GeneDoc: Analysis and Visualization of Genetic Variation.** *EMBNEW.NEWS.* 1997, **4**:14
- Ochman H, Moran NA: **Genes lost and genes found: evolution of bacterial pathogenesis and symbiosis.** *Science.* 2001, **292**: 1096-1099
- Ohta T: **Population size and the rate of evolution.** *J. Mol. Evol.* 1972, **1**: 305-314
- Ohta T: **The nearly neutral theory of molecular evolution.** *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 1992, **23**: 263-286
- Ow MC, Gantar M, Elhai J: **Reconstitution of a cycad-cyanobacterial association.** *Symbiosis.* 1999, **27**: 125-134
- Palenik B: **The genomics of symbiosis: hosts keep the baby and the bath water.** *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002, **99**: 11996-11967
- Pawlowski K, Bisseling T: **Rhizobial and Actinorhizal Symbioses: What Are the Shared Features?** *Plant Cell.* 1996, **8**: 1899-1913
- Pfeffer PE, Douds Jr DD, Becard G, Shachar-Hill Y: **Carbon uptake and the metabolism and transport of lipids in an arbuscular mycorrhiza.** *Plant Physiol.* 1999, **120**: 587-598
- Pfitzer, E: **Über den Bau und die Zellteilung der Diatomeen.** *Bot. Zeitung.* 1869, **27**: 774-776
- Prechtel J, Kneip C, Lockhart P, Wenderoth K, Maier UG: **Intracellular Spheroid Bodies of *Rhopalodia gibba* Have Nitrogen-Fixing Apparatus of Cyanobacterial Origin.** *Mol Biol Evol.* 2004, **21**: 1477-1481
- Rai AN: **Cyanobacteria-fungal symbioses: the cyanolichens.** In Rai AN (ed.), Handbook of symbiotic cyanobacteria. *CRC Press, Inc., Boca Raton, Fla.* 1990: 9-41
- Raven JA: **Evolution of cyanobacterial symbioses.** In: Cyanobacteria in symbiosis, Rai N, Bergamn B, Rasmussen U (ed.), *Dordrecht, The Netherlands: Kluwer* 2002: 239-333
- Rispe C, Moran NA: **Accumulation of deleterious mutations in endosymbiosis: Muller's ratchet with two levels of selection.** *Am. Nat.* 2000, **156**: 424-441

Rocap G, Larimer FW, Lamerdin J, Malfatti S, Chain P, Ahlgren NA, Arellano A, Coleman M, Hauser L, Hess WR, Johnson ZI, Land M, Lindell D, Post AF, Regala W, Shah M, Shaw SL, Steglich C, Sullivan MB, Ting CS, Tolonen A, Webb EA, Zinser ER, Chisholm SW: **Genome divergence in two *Prochlorococcus* ecotypes reflects oceanic niche differentiation.** *Nature*. 2003, **424**: 1042-1047

Roth LE, Jeon KW, Stacey G: **Homology in endosymbiotic systems: the term 'symbiosome'.** *Molecular Genetics of Plant-Microbe Interactions*. Edited by Palacios R, Verma DPS. St. Paul, Minnesota; APS Press 1988: 220-225

Saitou N, Nei M: **The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees.** *Mol Biol Evol*. 1987, **4**: 406-425

Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T: **Molecular Cloning. A laboratory manual.** *Cold Spring Harbor Laboratory Press*. 1998

Schnepf, E: **From prey via endosymbiont to plastid: comparative studies in dinoflagellates.** In: Lewis RA (ed.), *Origin of plastids*, *Chapman & Hall, New York and London*. 1992: 53-76

Schnepf E, Schlegel I, Hepperle D: ***Petalomonas sphagnophila* (Euglenophyta) and its endocytobiotic cyanobacteria : a unique form of symbiosis.** *Phycologia*. 2002, **41**: 153-157

Schwartz DC, Cantor CR: **Separation of yeast chromosome-sized DNAs by pulse-field gradient gel electrophoresis.** *Cell*. 1984, **37**: 67-75

Shigenobu S, Watanabe H, Hattori M, Sakaki Y, Ishikawa H: **Genome sequence of the endocellular bacterial symbiont of aphids *Buchnera* sp. APS.** *Nature*. 2000, **407**: 81-85

Smart LB, Anderson SL and McIntosh L: **Targeted genetic inactivation of the photosystem I reaction center in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803.** *EMBO J*. 1991, **10**: 3289-3296

Smith DC, Douglas AE: **The biology of symbiosis.** *London: Edward Arnold*. 1987

Soderback E, Bergman B: **The *Nostoc-Gunnera megallancia* symbiosis: phycobiliproteins, carboxysomes and rubisco in the cyanobiont.** *Physiol. Plant*. 1992, **84**: 425-432

Southern EM: **Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis.** *J. Mol Biol*. 1975, **98**: 503-517

Stepkowski T, Legocki AB: **Reduction of bacterial genome size and expansion resulting from obligate intracellular lifestyle and adaptation to soil habitat.** *Acta Biochim Pol*. 2001, **48**: 367-381

Steward WDP, Fitzgerald GP, Burris RH: **In situ studies on N₂ fixation using the acetylen reduction technique.** *Proc Natl Acad Sci USA*. 1967, **41**: 153-157

Tamas I, Klasson LM, Sandstrom JP, Andersson SG: **Mutualists and parasites: how to paint yourself into a (metabolic) corner.** *FEBS Lett*. 2001, **498**: 135-139

Tamas I, Klasson L, Canback B, Naslund AK, Eriksson AS, Wernegreen JJ, Sandstrom JP, Moran NA, Andersson SG: **50 million years of genomic stasis in endosymbiotic bacteria.** *Science*. 2002, **296**: 2376-2379

Tel-Or E, Steward WDP: **Photosynthetic components and activities of nitrogen-fixing heterocysts of *Anabaena cylindrica*.** *Proc R Soc London Ser B*. 1977, **198**: 61-86

Udvardi MK, Day DA: **Metabolite transport across symbiotic membranes of legume nodules.** *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*. 1997, **48**: 493-523

van Ham RC, Kamerbeek J, Palacios C, Rausell C, Abascal F, Bastolla U, Fernandez JM, Jimenez L, Postigo M, Silva FJ, Tamames J, Viguera E, Latorre A, Valencia A, Moran F, Moya A: **Reductive genome evolution in *Buchnera aphidicola*.** *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003, **100**: 581-586

Wernegreen JJ: **Genome evolution in bacterial endosymbionts of insects.** *Nat Rev Genet*. 2002, **3**: 850-861

Werner D: **Physiology of nitrogen-fixing legume nodules: compartments and functions.** In Stacey G, Burris RH, Evans HJ (ed.), Biological nitrogen fixation. *Chapman & Hall, New York, N.Y.* 1992: 399-431

Winzer T, Bail A, Linder M, Linder D, Werner D, Müller P: **A novel 53-kDa nodulin of the symbiosome membrane of soybean nodules, controlled by *Bradyrhizobium japonicum*.** *Mol Plant Microbe Interact*. 1999, **12**: 218-226

Wittenberg JB, Appleby CA, Wittenberg BA: **The kinetics of the reactions of leghemoglobin with oxygen and carbon monoxide.** *J Biol Chem*. 1972, **247**: 527-531

Wolk CP, Ernst A, Elhai J: **Heterocyst metabolism and development.** In Bryant DA (ed.), The molecular biology of cyanobacteria. *Kluwer Academic Publishers, Boston, Mass.* 1994: 769-823

Yanisch-Perron C, Vieira J, Messing J: **Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors.** *Gene*. 1985, **33**:103-119

Zehr JP, Carpenter EJ, Villareal TA: **New perspectives on nitrogen-fixing microorganisms in tropical and subtropical oceans.** *Trends Microbiol*. 2000, **8**: 68-73

Zehr JP, Waterbury JB, Turner PJ, Montoya JP, Omoregie E, Steward GF, Hansen A, Karl DM: **Unicellular cyanobacteria fix N₂ in the subtropical North Pacific Ocean.** *Nature*. 2001, **412**: 635-638

7 Anhang

7.1 Accession-Nummern der Organismen für die phylogenetische 16S-Analyse

<i>RDP database locus identifier</i>	<i>Spezies</i>	<i>corresponding GENBANK accession number</i>
Cya.SAJ708	<i>Cyanothece</i> sp. PCC 7418	AJ000708
Cya.SAJ715	<i>Cyanothece</i> sp. PCC 7424	AJ000715
Glth.membr2	<i>Gloeotheca membranacea</i>	X78680
Mcs.aerug3	<i>Microcystis aeruginosa</i> str. NIES89	Z28700
Prcl.didem	<i>Prochloron didemn</i>	X63141
Llb.boryan	<i>Leptolyngbya boryanum</i> PCC 73110	X84810
Chms.sglbs	<i>Chamaesiphon subglobosus</i> PCC 7430	-
Sncy.6803	<i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803	D64000
Clmy.rei_C	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	J01395
Nico.tab_C	<i>Nicotiana tabacum</i>	V00165
Anti.sp_C	<i>Antithamnion</i> sp.	X54299
Chdr.cri_C	<i>Chondrus crispus</i>	Z29521
Cynd.cal_C	<i>Cyanidium caldarium</i> str. 14-1-1	X52985
Pyla.lit_C	<i>Pylaiella littoralis</i>	X14873
Crpm.phi_C	<i>Cryptomonas phi</i> str. F	S73904
Ochs.sp_C	<i>Ochrosphaera</i> sp. str. 181	X65101
Cynp.par_C	<i>Cyanophora paradoxa</i>	-
Mcs.holsat	<i>Microcystis holsatica</i>	U40336
Phrm.minut	<i>Phormidium minutum</i> str. D5	X62686
Glb.violac	<i>Gloeobacter violaceus</i> PCC 7421	-
Syn.7003	<i>Synechococcus</i> sp. PCC 7003	AB015059
Syn.elonga	<i>Synechococcus elongates</i>	D83715
Syn.6301	<i>Synechococcus</i> sp. PCC 6301	X03538
Psan.bicep	<i>Pseudoanabaena biceps</i> PCC 7367	AF091108
Llb.sp135	<i>Leptolyngbya</i> sp. str. VRUC 135 Albertano 1985/1	X84809
Anbn.cyli2	<i>Anabaena cylindrica</i> str. NIES19 PCC 7122	AF091150
Nost.muscr	<i>Nostoc muscorum</i> PCC 7120	X59559
Nost.punct	<i>Nostoc punctiforme</i> PCC 73102	AF027655
Ctx.spD253	<i>Calothrix</i> D253	X99213
Trd.sp1067	<i>Trichodesmium</i> sp. NIBB 1067	X70767
Osc.corall	<i>Oscillatoria corallinae</i> str. CJ1 SAG8.92	X84812
Lyn.cnfrvo	<i>Lyngbya confervoides</i> PCC 7419	AJ000714
=	<i>Cyanothece</i> ATCC51142 ATCC 51142	AF132771
=	<i>Cyanothece</i> sp. PCC 8801	AF296873
=	<i>Stanieria cyanosphaera</i>	AB039008
=	<i>Prochlorococcus marinus</i> PCC 9511	AF180967
=	symbiont of <i>Climacodium frauenfeldianum</i>	AF193247
=	sphaeroid body of <i>Rhopalodia gibba</i>	AJ582391

7.2 *Accession*-Nummern der Organismen für die phylogenetische NifD-Analyse

> AJ582390	sphaeroid body of <i>Rhopalodia gibba</i>
> AF003337	<i>Cyanothece</i> sp. ATCC51142
> U22146	<i>Synechococcus</i> sp.
> NP_485484	<i>Nostoc</i> sp. PCC7120
> ZP_00112320	<i>Nostoc punctiforme</i>
> V01482	<i>Anabaena</i> 7120
> D00666	<i>Plectonema boryanum</i>
> U49514	<i>Fischerella</i> sp. UTEX 1931
> AF167538	<i>Trichodesmium</i> sp.
> AF200742	<i>Azoarcus</i> sp.
> AF194084	<i>Burkholderia</i> sp.
> U53362	<i>Frankia</i> sp.
> M20568	<i>Azotobacter vinelandii</i>
> AF322012	<i>Bradyrhizobium japonicum</i>
> X95565	<i>Alcaligenes faecalis</i>
> Y00155	<i>Clostridium pasteurianum</i>
> X01139	<i>Parasponia rhizobium</i>

7.3 Oligonukleotide zum Schließen von Lücken zwischen Fosmid-*Contigs*

Alle Sequenzen in 5' → 3'-Richtung angegeben.

F13/1	:	CGT ACC AGG ACA GTT GAT CTT C
F13/2	:	ACT ACG ACT CCA ACA GCA GAT A
F13/3	:	GAG CCC CAT TTT CCA GAA ATT C
F13/4	:	GCA AAA TTG TCC AGG GCA AGA G
F13/5	:	CTA TTC ATA TTT AAC TGA AGC
F13/6	:	GGT AGT TCG TCC TGA TTA TCC C
F13/7	:	GGC GAT CAC GCT GTT AGA TAA G
F13/8	:	CAC CCG CTG CTA TCA TTG ACT TTG
F13/9	:	CAC GGA TAA TAA CGT GAG CTA G
F13/10	:	GTA GAT GGG GTT GCT GTC TTG G
F13/11	:	CCC AGA AGA TCA GTA TAT TCT GG
F13/12	:	GAT AGT GGC TTT GTT GTG GGG TGT
F13/13	:	CTG AAT CAC CAG ATG CTC TTA GG
SK F13/14	:	CAC TTA AAT GCC CCC TTA TCT AGG
F15/1	:	GTC TTT AGG TAT TTT ATG ACT GAG
F15/2	:	GGA GTT TGA TCA ATT AAG ATG AC
Cy/1	:	GGG CAT TTT TAT TGC CTA AAG GC
Cy/1b	:	G CCA TTG TTC TCG TCT TAA TTG ACG
Cy/2	:	GAA CGA AAA TGA GGT AAG CGC
Cy/3	:	GTT GAT TGC AGC ACA TTG TC
Cy/4	:	CCA CAT TAG GCT TGG GGT AAT TG
Cy/5	:	CCT TGT TCA GCA CAA TTG GG
Cy/6	:	GAT GCT ACG ACT TCC TAT CCC
Cy/7	:	GTC GGC AAT GAG CTT CTT ATT GTC
Cy/8	:	CGC TTA GTA GGA TTG AGG ATC
Cy/9	:	GTT CGG ATT ATT GAA GCC TCC
Cy/10	:	GGG TGT GCA TTT CGA TAG GCA TC
Cy/11	:	GCT TTA ATT CTA GCA GTT GGA G
Cy/12	:	CAA CTG AGG CGA GTA ATC TC
Cy/14	:	GTG AAT TCG GGA TAA GCT CAA C
Cy/15	:	CCC GGT TTT ATT AGT CCT GTT
Cy/16	:	CTG GTC CAG CAA TAC CAA AAC AG
Cy/17	:	CAT TCA ACA GAG AGA CAG AAC AC
Cy/18	:	GAC TTC TCG CAG TTA TGT AAC CG
Cy/20	:	CCG GGA TAG AGG TGA ATT TTC
Cy/21	:	CAG TTT CTT GGG GAT AAA CTC G

Cy/22 : GTA TGG GGT GAG ACT CTA AAA CTC
Cy/23 : CAT TCG TCC CAT CAT AAA CAC TC
Cy/24 : GAC GAG CTA ACT CTT GTT GAA TG
Cy/25 : GCA AAA GGG TGG TCT TGA GTA AAC

Cy/26 : CGA CGC TAA CCC GTA GAG TTA TTC
Cy/27 : CAT CTA TGC TGC GAA TAA TCC C
Cy/28 : GAA ATC CCT CAT AGC TTA AAG GC
Cy/29 : GCC GGG GCA TTA TTA GGA AAA C

7.4 Aminosäuren-Bezeichnung und -Abkürzungen

Glycin	Gly	G
Alanin	Ala	A
Valin	Val	V
Leucin	Leu	L
Isoleucin	Ile	I
Serin	Ser	S
Threonin	Thr	T
Cystein	Cys	C
Methionin	Met	M
Prolin	Pro	P
Phenylalanin	Phe	F
Tyrosin	Tyr	Y
Tryptophan	Trp	W
Asparagin	Asn	N
Glutamin	Gln	Q
Asparaginsäure	Asp	D
Glutaminsäure	Glu	E
Arginin	Arg	R
Lysin	Lys	K
Histidin	His	H

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Maier für die interessante Themenstellung, die Bereitstellung des Arbeitsplatzes sowie finanzieller und sonstiger Mittel. Sein stetes Interesse am Fortgang der Arbeit und die zahlreichen Diskussionen und Anregungen haben diese Arbeit begleitet und zu den Ergebnissen beigetragen.

Des Weiteren gilt mein Dank Herrn Prof. Dr. Klaus Lingelbach für die Übernahme der Zweitbegutachtung.

Weiterhin möchte ich Dr. Stefan Zauner und Oliver Kawach für ihre „Klopf“- und Kopfarbeit bei der Anfertigung und Auswertung zahlreicher Sequenziergele danken.

Marianne Johannsen danke ich für die Anfertigung der Präparate für die Elektronenmikroskopie und *in-situ* Hybridisierungen sowie für die Entwicklung der Bilder.

Für seine Unterstützung sowie für seine stoische Ruhe im Laboralltag möchte ich mich bei Dr. Klaus Wenderoth bedanken.

Dr. Peter Lockhart (Palmerston North, Neuseeland) danke ich für die phylogenetischen Analysen und die Berechnung der Stammbäume.

Dr. Franz Grolig danke ich für seine Unterstützung bei KLSM-Untersuchungen.

Ein ganz großes Dankeschön an die Mitarbeiter der AG Maier, insbesondere Oliver, Sven, Elmar, Stefan, Maik, Martina und Jonci für das gute Laborklima und auch für die gemeinsamen Stunden außerhalb des Labors. Für die vielen - manchmal tatsächlich wissenschaftlich fruchtbaren - Rauchseminare möchte ich mich außerdem bei Martin bedanken.

Für das Korrekturlesen der Arbeit danke ich Stefan Zauner und Nina Geldmacher.

Meinen Eltern danke ich für ihr Vertrauen und ihre Unterstützung innerhalb und außerhalb meines Studiums.

